

**Interaktionsanalyse der Hypoxie-induzierbaren
Transkriptionsfaktoren HIF-2 α und ARNT unter
Berücksichtigung der Einflussnahme durch den HIF-2 α -
Liganden *N*-(3-*Chloro*-5-*fluorophenyl*)-4-
nitrobenzo[*c*]/[1,2,5]*oxadiazol*-5-*amine* und verschiedener
HIF-2 α -Mutationen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrads

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Irina Pisarenko, M.Sc.

Fakultät der Chemie

Universität Duisburg-Essen

Oktober 2017

Die in dieser Arbeit beschriebenen und interpretierten Laborexperimente wurden in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Fandrey, am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen, im Zeitraum von August 2013 bis September 2016 durchgeführt. Die Promotion wurde durch das Graduiertenkolleg 1431 unterstützt.

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Fandrey
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Epple

Vorsitzender im Disputationsverfahren: Prof. Dr. M. Ulbricht

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2018

Kongressbeiträge

Pisarenko I., Bernardini A., Otto T., Hu J., Fandrey J. (2013). *Modification of the assembly process of Hypoxia-inducible Factors (HIFs)*. **(Poster) Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen**, Essen, 22. November 2013

Pisarenko I., Bernardini A., Otto T., Hu J., Fandrey J. (2014). *Modification of the assembly process of Hypoxia-inducible Factors (HIFs)*. **(Poster) 93rd Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft**, Mainz, 13. bis 14. März 2014

Pisarenko I. (2014). *Analysis of interaction between hypoxia-inducible transcription factor (HIF) proteins using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy*. **(Vortrag) Final Annual Retreat Graduiertenkolleg 1431**, Mülheim an der Ruhr, 9. Juli 2014

Pisarenko I. (2014). Analysis of interaction between hypoxia-inducible transcription factor (HIF) proteins using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy. **(Vortrag) 3rd Symposium of the Young Physiologists**, Bonn, 26. September 2014

Pisarenko I., Bernardini A., Otto T., Hu J., Fandrey J. (2014). *Analysis of interaction between hypoxia-inducible transcription factor (HIF) proteins using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy*. **(Poster) Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen**, Essen, 21. November 2014

Pisarenko I., Bernardini A., Otto T., Hu J., Fandrey J. (2015). *Analysis of interaction between hypoxia-inducible transcription factor (HIF) proteins using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy*. **94th Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft**, Magdeburg, 6. März 2015

Pisarenko I., Bernardini A., Otto T., Hu J., Fandrey J. (2015). *Analysis of interaction between hypoxia-inducible transcription factor (HIF) proteins using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy.* **(Poster) Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen**, Essen, 20. November 2015

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren – Struktur und Funktion.....	1
1.1.1. HIF-1 α und HIF-2 α	5
1.2. Die PAS-Domäne von HIF-2α.....	7
1.3. Künstliche Liganden für die HIF-2α-PAS-B-Domäne	8
2. ZIELE DER ARBEIT	13
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1. Material	14
3.1.1. Zellmaterial	14
3.1.2. Bakterien.....	14
3.1.3. Plasmide.....	14
3.1.4. Chemikalien und Kits.....	17
3.1.5. Geräte	17
3.2. Methoden	18
3.2.1. Methoden für die Zellkultur	18
3.2.1.1. Subkultivierung einer Monolayerkultur.....	18
3.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl.....	19
3.2.1.3. Transiente Transfektion	19
3.2.2. Molekularbiologische Methoden	20
3.2.2.1. Isolierung der Gesamt-RNA mit Phenol-Chlorophorm	20
3.2.2.2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	21
3.2.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
3.2.2.4. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	24
3.2.2.5. Relative mRNA-Bestimmung mittels <i>Real-time</i> - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	24
3.2.2.6. Bakterientransformation	26
3.2.2.7. Plasmid-Isolierung.....	27
3.2.2.8. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	27
3.2.2.9. Sequenzierung	28
3.2.2.10. Ortsspezifische Mutagenese	29
3.2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	32
3.2.3.1. Proteinisolierung aus Monolayer-Kulturen.....	32
3.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	34
3.2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.2.3.4. Westernblot	36
3.2.3.5. Immundetektion	37
3.2.3.6. Co-Immupräzipitation	39
3.2.4. Konfokale Lasermikroskopie (Förster-Resonanz-Energietransfer)	40
3.2.4.1. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	40

3.2.4.2.	<i>Sensitized Emission-FRET</i>	44
3.2.4.3.	Auswertung einer FRET-Messung	46
3.2.4.4.	Aufbau der Apparatur für FRET-Messungen	48
4.	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG	49
4.1.	Untersuchung der Interaktionen von HIF-Untereinheiten mittels FRET	49
4.1.1.	Der Einfluss von Mutationen auf die HIF-2 α / ARNT- Interaktion	50
4.1.2.	Interaktionsanalyse zwischen HIF-1 α und HIF-2 α sowie HIF-2 α und HIF-2 α	57
4.1.3.	Einfluss des HIF-2-Antagonisten auf die Heterodimerisierung von HIF-2 α und ARNT ..	60
4.2.	Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	66
4.2.1.	Interaktionsanalyse zwischen HIF-1 α und HIF-2 α bzw. HIF-2 α und HIF-2 α	66
4.2.2.	Die Wirkung des HIF-2 α -Antagonisten auf die HIF-2 α / ARNT und HIF-2 α / HIF-2 α - Interaktion	69
4.3.	Genexpressionsanalyse	73
5.	DISKUSSION	77
5.1.	Der Einfluss von Mutationen in der HIF-2α-Untereinheit auf die Interaktion mit ARNT	78
5.2.	Interaktion zwischen HIF-1α und HIF-2α	79
5.2.1.	Genexpression	81
5.3.	Der Einfluss des HIF-2α-Antagonisten auf die HIF-2α / ARNT-Interaktion	83
5.4.	Einfluss des HIF-2α-Antagonisten auf die HIF-2α / HIF-2α-Interaktion	87
	Zusammenfassung	88
	Summary	89
	Abkürzungsverzeichnis	91
	Abbildungsverzeichnis	95
	Tabellenverzeichnis	97
	Literaturverzeichnis	98
	Danksagung	104
	Erklärungen	106
	Lebenslauf	107

1. Einleitung

1.1. Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren – Struktur und Funktion

Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (HIFs) regulieren die Expression der Gene, die für die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel (Hypoxie) verantwortlich sind (Fandrey *et al.* 2006). HIFs spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Zellprozessen, wie z. B. Vaskulogenese und Angiogenese, Zellmigration und Signaltransduktion (Lisy und Peet 2008). Da solide Tumore oft hypoxische Regionen aufweisen, sind HIFs auch in Tumorerkrankungen involviert und können die Metastasierung sowie Resistenz zur Strahlen- und Chemotherapie fördern (Semenza 2012).

HIFs sind Heterodimere, die aus einer O₂-abhängigen α -Untereinheit (α -UE) und einer, in der Zelle konstitutiv exprimierten, β -UE, auch als *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bezeichnet, bestehen. Es sind drei Isoformen der α -UE, HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α , sowie drei Isoformen von ARNT, ARNT1, ARNT2 und ARNT3, bekannt (Lisy und Peet 2008). Unter Hypoxie wandert die α -UE aus dem Zytoplasma in den Zellkern und bildet dort mit ARNT ein Dimer. Der entstandene Transkriptionskomplex bindet an die HIF-spezifische DNA-Sequenz, die sog. HRE- (*hypoxia response elements*) Sequenz und löst eine Hypoxie-induzierte Genexpression aus (Fandrey *et al.* 2006) (vgl. Abb. 1-1).

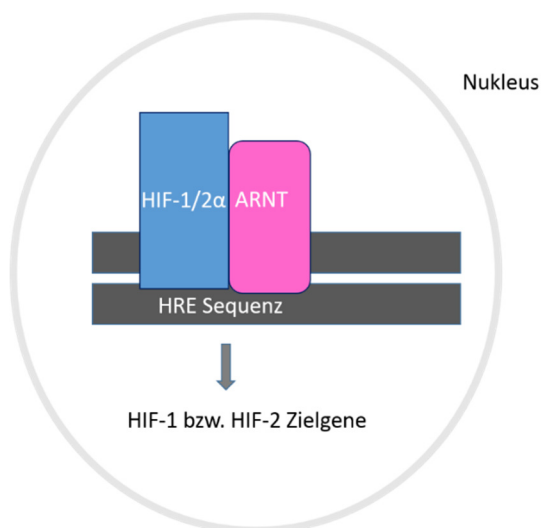


Abb. 1-1 Schematische Darstellung eines aktiven HIF-1 α / ARNT- bzw. HIF-2 α / ARNT-Transkriptionskomplexes. Bei niedrigem pO₂-Gehalt in der Zelle bindet das aktive HIF- α / ARNT Heterodimer im Nukleus an die Doppelhelix der DNA und löst eine Transkription von HIF-spezifischen Genen aus.

Während HIF-1 α und HIF-2 α im Komplex mit ARNT eine Genexpression induzieren, wird der HIF-3 α -Isoform die Rolle eines negativen Regulators bei der Hypoxie-induzierten Gentranskription beigemessen (Gu *et al.* 1998, Hara *et al.* 2001). Die Überexpression von HIF-3 α in COS-7-Zellen führte zur Suppression der HIF-1 α - und HIF-2 α -induzierten Genexpression (Hara *et al.* 2001).

Die Untereinheiten HIF- α und ARNT gehören zur Familie der bHLH- (*basic helix loop helix*) Proteine, die eine *Per-ARNT-Sim-* (*Period / ARNT / Single minded*) Domäne aufweisen (Semenza *et al.* 1997) (vgl. Abb. 1-2).

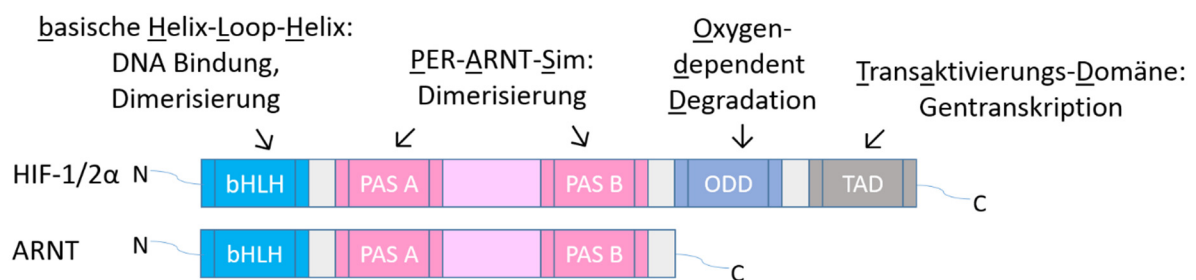


Abb. 1-2 Domänenstruktur der Hypoxie-induzierbaren Faktoren. HIF-1 α und HIF-2 α weisen beide die gleiche Domänenstruktur auf. Bei ARNT fehlen die Oxygen-dependent Degradation Domain (ODD) und die Transaktivierungs-Domäne (TAD). ARNT wird unabhängig vom O₂-Gehalt in der Zelle stabil exprimiert und hat keine TAD.

Die basische Helix-Loop-Helix-Domäne ist für die Bindung des HIF-Transkriptionskomplexes an die DNA verantwortlich (Semenza *et al.* 1997). Dabei nimmt die HLH-Region an der Dimerisierung der beiden HIF-Untereinheiten teil und die basische Region dient der Bindung des HIF- α / ARNT- Dimers an die HRE-Sequenz der DNA (vgl. Abb. 1-3).

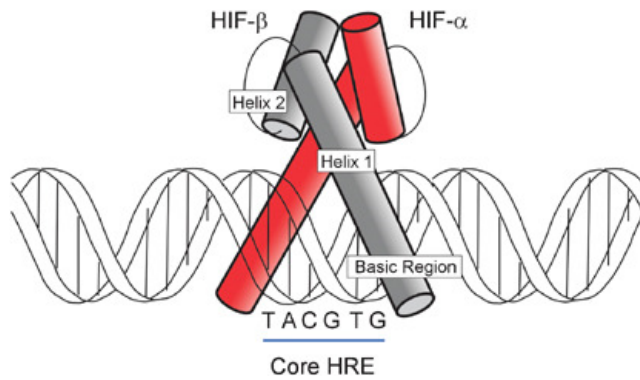


Abb. 1-3 Funktion der bHLH-Domänen von HIF- α und ARNT (HIF- β). Die HLH-Motive der Untereinheiten HIF- α und ARNT dimerisieren und binden über ihre basischen Regionen an die HRE-Sequenz der DNA-Doppelhelix (Lisy und Peet 2008).

Allerdings reicht die Protein-Protein-Interaktion der bHLH-Domänen von HIF- α und ARNT nicht aus, um einen aktiven HIF-Transkriptionskomplex zu bilden. Für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten spielt die sog. PAS-Domäne eine wichtige Rolle (Semenza *et al.* 1997). PAS ist ein Akronym aus folgenden drei Proteinen, in denen die Wiederholungssequenzen zum ersten Mal identifiziert wurden: *period clock* (PER) in *Drosophila*, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) in Wirbeltieren und *single-minded protein* (SIM) in *Drosophila*. In Eukaryonten besteht die PAS-Domäne insgesamt aus ca. 270 Aminosäureresten mit zwei *Repeats*, PAS-A und PAS-B, von je ca. 50 Aminosäureresten (Taylor und Zhulin 1999). Erst das Zusammenspiel der bHLH- und PAS-Domänen von HIF- α und ARNT ermöglicht die Bildung eines funktionsfähigen Transkriptionskomplexes (Semenza *et al.* 1997). Die Domänen-Interaktionen sind am Beispiel des HIF-2 α / ARNT-Komplexes in der Abb. 1-4 gezeigt.

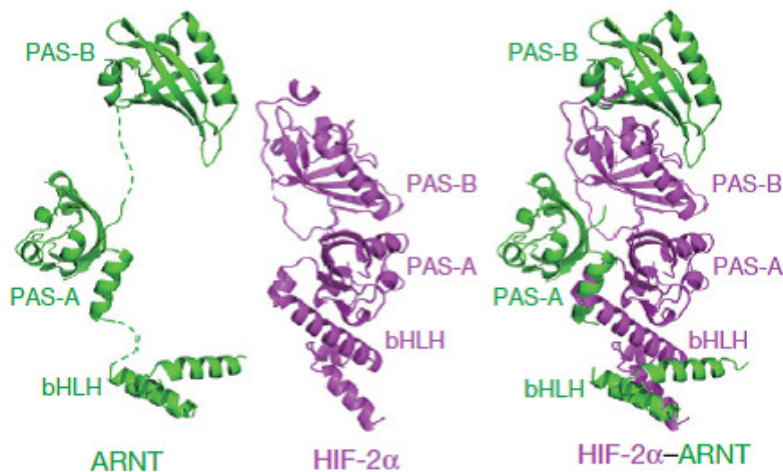


Abb. 1-4 Komplexbildung zwischen HIF-2α und ARNT. Die Heterodimerisierung der beiden HIF-Untereinheiten erfolgt über ihre bHLH-, PAS-A- und PAS-B-Domänen. Die Domänen von ARNT sind in grün und die von HIF-2α in magenta dargestellt. Jede einzelne Domäne der einen Untereinheit interagiert mit ihrem Analogon von der anderen (Wu *et al.* 2015).

Zusätzlich zu der bHLH- und PAS-Domäne besitzt die HIF-α-UE eine so genannte *oxygen dependent degradation domain* (ODD) (vgl. Abb. 1-2). Wie der Name schon sagt, reguliert die ODD-Domäne den Abbau von HIF-α in Abhängigkeit vom O₂-Gehalt in der Zelle.

In der ODD-Domäne befinden sich zwei wichtige Prolinreste, Pro402 und Pro564 in HIF-1α und Pro405 sowie Pro531 in HIF-2α (Loboda *et al.* 2012). Die Prolinreste werden unter Normoxie (hoher O₂-Gehalt in der Zelle) durch die Enzyme Prolylhydroxylasen hydroxyliert (vgl. Abb. 1-5). Durch die Hydroxylierung der beiden Prolinreste wird das HIF-α vom Protein des Tumorsuppressor-Gens *von-Hippel-Lindau* (pVHL) erkannt, ubiquitinyliert und anschließend im Proteosom abgebaut. Eine weitere Kontrolle der Aktivität von HIF-α erfolgt durch die Hydroxylierung eines Asparagins in der C-terminalen Transaktivierungs-Domäne (C-TAD) durch die Asparaginy-Hydroxylase, genannt *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1). FIH-1 hydroxyliert Asparagin, Asn803 in HIF-1α und Asn851 in HIF-2α, bei hohem O₂-Gehalt in der Zelle. Unter Hypoxie liegt das Asparagin unhydroxyliert in der Zelle vor und rekrutiert Transkriptions-Coaktivatoren p300 und CBP (*creb binding protein*). Die Rekrutierung von p300 und CBP führt zur Aktivierung der Transkription durch das HIFα / β-Dimer nach Bindung an die HRE (*hypoxia response elements*) der DNA im Zellkern (Loboda *et al.* 2012).

Prolyl- und Asparaginyhydroxylasen gehören zur Proteinfamilie der α-Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Diese Enzyme enthalten in ihrem aktiven Zentrum Eisen (Fe²⁺), an

das der molekulare Sauerstoff in Anwesenheit von α -Ketoglutarat bindet (Berra *et al.* 2006, Fandrey *et al.* 2006).

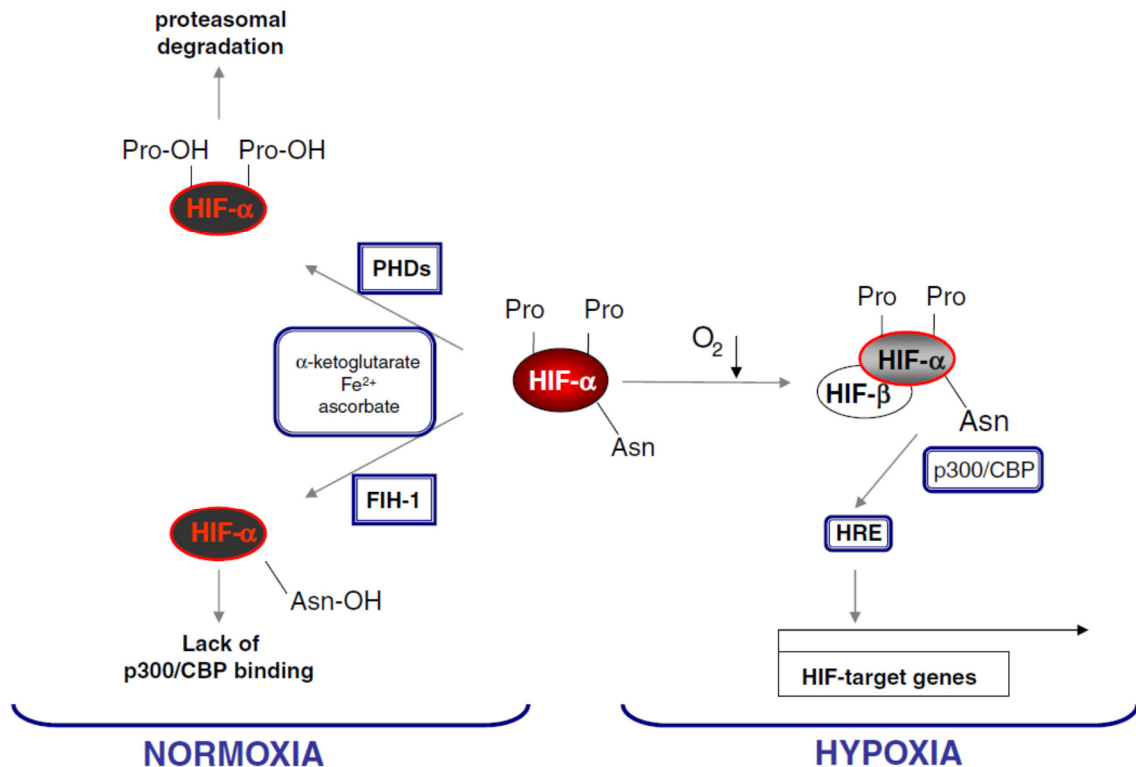


Abb. 1-5 Sauerstoff-abhängige Regulation von HIF- α . Bei hohem O_2 -Gehalt (Normoxie) in der Zelle werden zwei Prolinreste des HIF- α durch Prolylhydroxylasen (PHDs) und ein Asparaginrest durch eine Asparaginyhydroxylase, auch factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) genannt, hydroxyliert. Die Hydroxylierung der Prolinreste führt zum proteasomalen Abbau von HIF-2 α . Die Hydroxylierung des Asparaginrests verhindert die Bindung der Koaktivatoren p300 und CBP und damit die Transkription HIF-spezifischer Gene. Unter Hypoxie werden die beiden Prolinreste und der Asparaginrest nicht hydroxyliert. Dadurch kann die HIF-induzierte Genexpression erfolgen (Loboda *et al.* 2012).

1.1.1. HIF-1 α und HIF-2 α

Die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α sind sich in ihrer Struktur und Funktion aufgrund hoher Verwandtschaft ähnlich (Hu *et al.* 2007). Die Expression beider Isoformen führt zur HRE-abhängigen Transkription vieler gemeinsamer Zielgene. Trotz hoher Homologie werden die beiden Isoformen als unabhängige Transkriptionsfaktoren betrachtet, die neben gemeinsamen Zielgenen auch unterschiedliche Gene aktivieren können. Während HIF-1 α die für die glykolytischen Enzyme codierenden Gene wie z. B. die Hexokinase (HK), die Fructose-6-Phosphat Kinase (PFK), Lactat-Dehydrogenase (LDH-A) aktiviert (Semenza 2003), reguliert HIF-2 α den für die Embryonalentwicklung wichtigen Oktamer-bindenden Transkriptionsfaktor

4 (Oct-3/4, Pou5f1), den *transforming growth factor alpha* (TGF- α), den für die Zellproliferation und -Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor und Proto-Onkogen c-Myc oder den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) (Patel und Simon 2008).

Während HIF-1 α unter Hypoxie ubiquitär exprimiert wird (Dery *et al.* 2005), ist die Expression von HIF-2 α am höchsten in den Geweben, die für die Sauerstoffzufuhr verantwortlich sind, wie z. B. die Lunge, das Endothel und Herz (Tian *et al.* 1997, Wiesener *et al.* 2003). Trotz der starken HIF-2 α -Präsenz in den o. g. Geweben wird das Protein unter Hypoxie auch in Zellen anderer Organe wie z. B. Niere oder Hirn exprimiert (Wiesener *et al.* 2003).

HIF-1 α wurde zum ersten Mal durch Experimente an transgenen Mäusen identifiziert, die unterschiedliche Fragmente des kodierenden Gens für den hämatopoetischen Wachstumsfaktor Erythropoetin enthielten. Unter Hypoxie band der Transkriptionsfaktor HIF-1 α an die für Erythropoetin kodierenden Genabschnitte (Wang und Semenza 1995).

HIF-2 α , auch als EPAS1 (*endothelial PAS domain protein 1*), HLF (*HIF-like factor*) oder MOP2 (*member of the PAS superfamily 2*) bezeichnet, wurde durch das Screening einer cDNA-Bibliothek von HeLa-Zellen identifiziert (Tian *et al.* 1997). Der Sequenzvergleich mit HIF-1 α zeigte, dass beide α -Untereinheiten zu 48% homolog sind. HIF-1 α und HIF-2 α weisen eine hohe strukturelle Homologie in ihren bHLH-Domänen (85%) sowie PAS-A- und PAS-B-Domänen (68% bzw. 73%) auf (Tian *et al.* 1997). Außerdem sind die Aminosäurereste, welche die für die Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung essentiellen Prolinreste umgeben, in beiden α -Untereinheiten hoch konserviert. In ihren C-terminalen TAD-Domänen sind HIF-1 α und HIF-2 α zu 69% identisch (Hu *et al.* 2007). Dagegen zeigen die N-terminalen TAD-Domänen der beiden Transkriptionsfaktoren die größten Sequenzunterschiede. Während die C-TAD-Domänen für die Transkription gemeinsamer Zielgene von HIF-1 α und HIF-2 α verantwortlich sind, tragen die N-TAD-Domänen größtenteils zur Spezifität der Zielgene bei beiden α -Untereinheiten bei (Hu *et al.* 2007).

Die Überexpression von HIF-1 α wurde in vielen Karzinomtypen wie z. B. in Kolon-, Pancreas-, Eierstock-, Brust-, Haut-, Nieren-Karzinomen identifiziert (Zhong *et al.* 1999). Beiden HIF- α -Untereinheiten können ein und dasselbe Gen unterschiedlich regulieren. So erhöht die HIF-2 α -UE die transkriptionale Aktivität von c-Myc und fördert die Zellzyklus-Progression im klarzelligen Nierenzellkarzinom, während HIF-1 α die transkriptionale Aktivität von c-Myc inhibiert (Gordan *et al.* 2007).

1.2. Die PAS-Domäne von HIF-2 α

Wie schon in 1.1 erwähnt, sind die PAS- (*Per-ARNT-SIM*) Domänen für die Bildung eines stabilen HIF- α / ARNT-Heterodimers verantwortlich. Erbel *et al.* zeigten, dass die PAS-B-Domänen von HIF-2 α und ARNT direkt aneinander *in vitro* binden, wobei die Interaktion über ihre β -Faltblätter erfolgt. Die PAS-B-Domäne von HIF-2 α besteht aus einem 5strängigen, antiparallelen β -Faltblatt, das von α -Helices flankiert wird (Erbel *et al.* 2003). Die Bindungsstelle für ARNT ist größtenteils hydrophob.

Die Struktur der Domäne ist in der Arbeit von Wu *et al.* detailliert gezeigt (vgl. Abb. 1-6). Für die Heterodimerisierung der PAS-B-Domänen von HIF-2 α und ARNT sind die Aminosäurereste Gln322, Met338 und Tyr342 in der HIF-2 α -PAS-B-Domäne essentiell (Erbel *et al.* 2003). Die Aminosäurereste befinden sich an der Solvens-exponierten Oberfläche des β -Faltblatts, in den Strängen H β und I β . Der Ersatz dieser Aminosäuren durch andere (Gln322Glu, Met338Glu und Tyr342Thr) führte zur bedeutenden Schwächung der Interaktion von HIF-2 α - und ARNT-PAS-B *in vitro*. Verglichen mit dem Wildtyp-HIF-2 α führte die Überexpression des HIF-2 α -Proteins mit vollständiger Aminosäuresequenz, das die o. g. Mutationen enthielt, in CHO- und K13-Zellen zur Reduktion seiner HIF-2-abhängigen transkriptionalen Aktivität (Erbel *et al.* 2003).

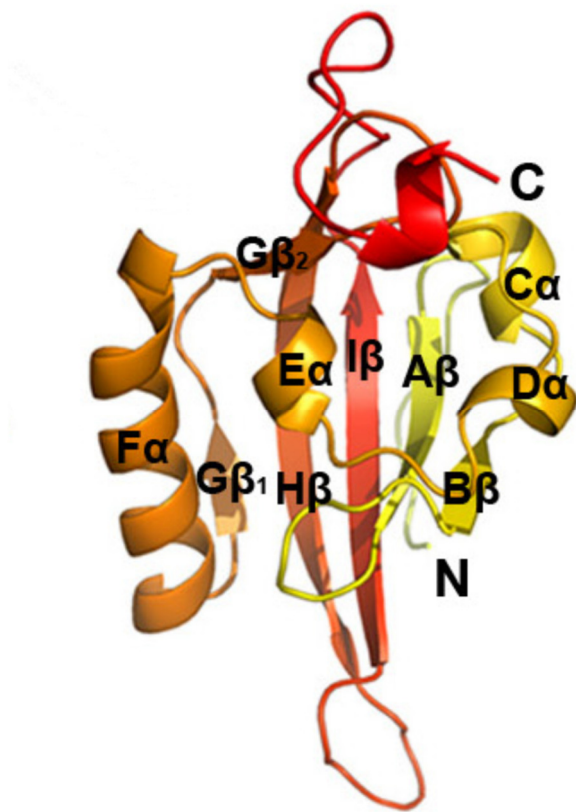


Abb. 1-6 Die Sekundärstruktur-Elemente der PAS-B-Domäne von HIF-2 α (Wu *et al.* 2015).

Im Gegensatz zu den PAS-Domänen von manchen anderen Proteinen wie z. B. von LOV2 (*light oxygen voltage 2*) bindet die PAS-B-Domäne von HIF-2 α keine natürlichen Cofaktoren. Trotz der Abwesenheit von natürlichen Liganden könnte die Solvens-exponierte Oberfläche des β -Faltblatts der HIF-2 α -PAS-B-Domäne für die Bindung künstlicher niedermolekularer organischer Verbindungen genutzt werden, um die Heterodimerisierung mit ARNT zu regulieren bzw. zu hemmen (Erbel *et al.* 2003).

1.3. Künstliche Liganden für die HIF-2 α -PAS-B-Domäne

Scheuermann *et al.* generierten ein hochaffines HIF-2 α -PAS-B / ARNT-PAS-B-Heterodimer, bei dem der Aminosäurerest Arginin an der Position 247 in der HIF-2 α -PAS-B-Domäne durch die Glutaminsäure (Arg247Glu) und der Aminosäurerest Glutaminsäure an der Position 362 in der ARNT-PAS-B-Domäne durch Arginin (Glu362Arg) ersetzt wurden. Um den Heterodimer

vom Wildtyp zu unterscheiden, wurde dieser als HIF-2 α -PAS-B* / ARNT-PAS-B* bezeichnet (Scheuermann *et al.* 2009).

Die Untersuchungen mittels der Röntgenkristallographie und NMR zeigten einen 290 Å³-großen, mit Wasser gefüllten Hohlraum im Kern der HIF-2 α -PAS-B*-Domäne (Scheuermann *et al.* 2009). Der Hohlraum ist mit Wassermolekülen besetzt, die über Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit polaren Seitenketten der PAS-B*-Domäne interagieren. Solche Domänen eignen sich besonders gut als *Targets* für kleine Liganden, weil der mit Wasser gefüllte Hohlraum auch mit niedermolekularen Verbindungen besetzt werden kann (Scheuermann *et al.* 2013). Als Folge können Protein-Protein-Interaktionen, die über die PAS-Domäne erfolgen, beeinflusst werden. Durch das NMR-basierte Screening organischer, niedermolekularer Verbindungen aus einer Molekül-Bibliothek identifizierten Scheuermann *et al.* künstliche Liganden, die selektiv an die Wildtyp-PAS-B-Domäne von HIF-2 α binden konnten (Scheuermann *et al.* 2009). Die meisten der identifizierten Liganden bestanden aus zwei substituierten aromatischen Ringen, die durch einen *Linker* (ein- oder zwei-atomar) miteinander verbunden waren (vgl. Abb. 1-7 a)). Diese Substanzen interagierten nicht mit den PAS-B-Domänen von HIF-1 α oder ARNT. Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Verbindung ausgewählt, die einen stabilen Komplex mit der HIF-2 α -PAS-B-Domäne in Abwesenheit der ARNT-PAS-B-Domäne bildete, wie die Ergebnisse des ¹⁵N/¹H HSQC (¹⁵N/¹H *heteronuclear single quantum correlation*)-Assays und der ITC (*isothermal titration calorimetry*) zeigten. Mit Hilfe der Röntgenkristallographie konnte auch die Struktur des Komplexes zwischen dem HIF-2 α -PAS-B* / ARNT-PAS-B*-Heterodimer und dem Liganden entschlüsselt werden (Scheuermann *et al.* 2009). Jedoch konnte die Kristallstruktur des Liganden mit der Wildtyp-PAS-B-Domäne nicht aufgeklärt werden. Die Durchführung der für die Strukturaufklärung nötigen NMR-Studien wurde durch störende Resonanzlinienverbreiterungen der Aminosäurereste im NMR-Spektrum, die sich nah an der Liganden-Bindungsregion in der PAS-B-Domäne befanden, behindert. Außerdem konnte dieser Ligand die Interaktion zwischen den Wildtyp-PAS-B-Domänen von HIF-2 α und ARNT nur schwächen und nicht komplett hemmen, wie die Ergebnisse des ¹⁵N/¹H HSQC-Assays mit ¹⁵N-ARNT-PAS-B zeigten.

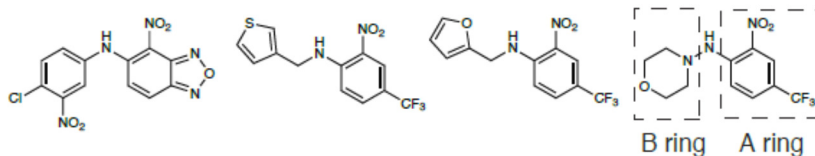
Ausgehend von der chemischen Struktur des o. g. Liganden wurden mit Hilfe eines AlphaScreen (*amplified luminescent proximity homogenous assay*)-Assays neue Verbindungen identifiziert, die für die Inhibierung des Heterodimers HIF-2 α -PAS-B / ARNT-PAS-B besser optimiert sein sollten. Die Röntgenkristallstruktur des hochaffinen HIF-2 α -PAS-B* / ARNT-PAS-B*-Heterodimers mit der wirksamsten Verbindung, die von Scheuermann *et al.* im Jahr 2013 identifiziert wurde, ist in der Abb. 1-7 b) dargestellt. In dieser Struktur besetzt der Ligand

den Hohlraum der HIF-2 α -PAS-B*-Domäne anstelle von Wassermolekülen, die dort in Abwesenheit des Liganden präsent wären. Der Ligand interagiert mit den Seitenketten der Aminosäuren, die ihn umgeben, über elektrostatische Wechselwirkungen. Die Nitro-Gruppe und das sekundäre Amin (Linker) des Liganden interagieren mit dem Imidazol-Ring des Histidins an der Position 248. Zusätzlich wird eine intramolekulare H-Brücke zwischen dem Linker-Amin und der Nitro-Gruppe des A-Rings gebildet. Eine weitere wichtige Wasserstoff-Brückenbindung liegt zwischen der Hydroxyl-Gruppe von Tyrosin 281 (Y281) in der HIF-2 α -PAS-B*-Domäne und dem A-Ring des Liganden vor.

Die höhere Affinität dieser Verbindung zur HIF-2 α -PAS-B*-Domäne im Vergleich zu den vorher untersuchten Verbindungen resultiert nach Scheuermann *et al.* zum einen aus der Substitution des Benzol-Rings (B-Ring) mit zwei Halogenen (Cl und F), die besser in die hydrophobe Umgebung des Hohlraums der HIF-2 α -PAS-B-Domäne eingegliedert werden können. Zum anderen interagiert der Oxadiazol-Ring des Liganden mit Serin an der Position 292. Dieser Ligand bindet an die HIF-2 α -PAS-B-Domäne mit einer Dissoziationskonstante K_D von 81 nM.

Scheuermann *et al.* zeigten, dass diese Verbindung nicht nur die Heterodimerisierung der HIF-2 α -PAS-B*- / ARNT-PAS-B*-Domänen *in vitro* inhibiert, sondern auch die Interaktion zwischen dem Wildtyp-HIF-2 α und -ARNT mit ihren vollständigen Aminosäuresequenzen stark beeinträchtigt (Scheuermann *et al.* 2013). Hierfür wurden die Co-Immunpräzipitations-Experimente durchgeführt, bei denen die nukleären Extrakte aus den hypoxischen Hep3B-Zellen isoliert und danach mit dem Liganden inkubiert wurden. Folglich wurde die Bindung des HIF-2 α -Proteins an ARNT, die sog. Co-Immunpräzipitations-Effizienz, untersucht. Es wurde festgestellt, dass sich mit zunehmender Liganden-Konzentration die Co-Immunpräzipitations-Effizienz verringerte (Scheuermann *et al.* 2013). Zusätzlich wurde die mRNA-Expression der HIF-2-Zielgene, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) in 786-0-Zellen und EPO (*Erythropoietin*) in Hep3B-Zellen, nach der Zugabe des Liganden reduziert. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA-Expression des HIF-1-Zielgens PGK1 (*phosphoglycerate kinase 1*) nach der Inkubation von Hep3B-Zellen mit dem Liganden nicht behindert.

a)



b)

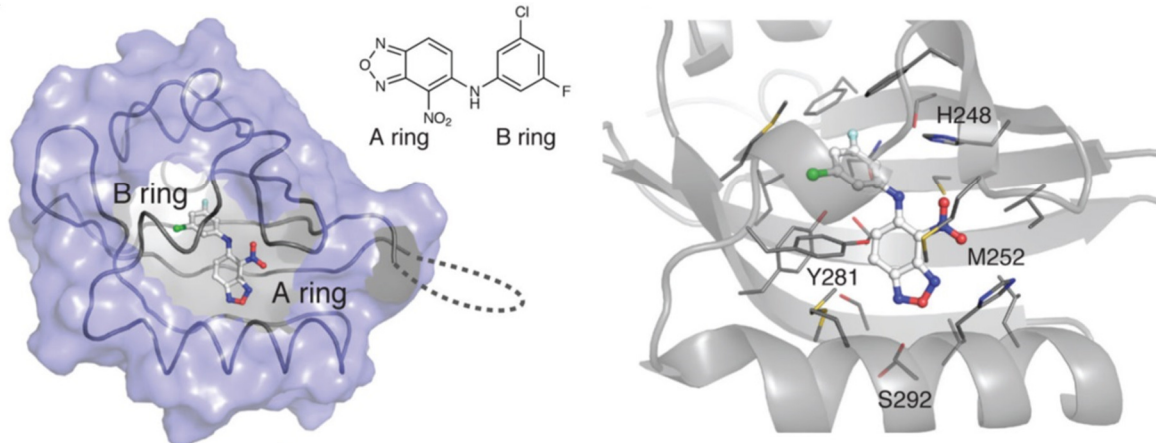


Abb. 1-7 Liganden für die HIF-2 α -PAS-B-Domäne. Beispiele der identifizierten Verbindungen, die eine selektive Affinität zur HIF-2 α -PAS-B-Domäne aufweisen (a)). Die Röntgenkristallstruktur des Komplexes der HIF-2 α -PAS-B*-Domäne mit dem Liganden, der die höchste Effektivität aufwies (b)). Der Hohlraum der PAS-B-Domäne ist in grau und der Ligand ist als das Kugel-Stab-Modell dargestellt. Links sind Seitenketten der Aminosäuren abgebildet, die über van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit dem Liganden interagieren (Scheuermann *et al.* 2013).

Im Jahr 2015 wurden neue Studien von Scheuermann *et al.* über die Struktur potentieller HIF-2 α -Antagonisten veröffentlicht. Nach diesen Studien weisen chirale Verbindungen (vgl. Abb. 1-8), die aus einem Tetrazol-Ring (A-Ring) und zwei Benzol-Ringen (B- und C-Ring) bestehen, eine höhere Affinität zur HIF-2 α -PAS-B-Domäne als die vorher beschriebenen Liganden auf (Scheuermann *et al.* 2015).

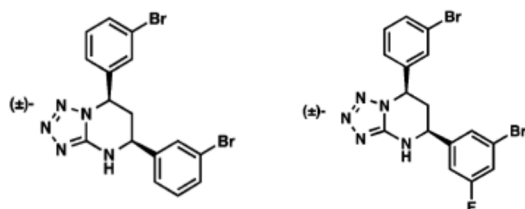


Abb. 1-8 Beispiele der chiralen HIF-2 α -Inhibitoren (Scheuermann *et al.* 2015).

Dagegen ist die in dieser Arbeit untersuchte Verbindung (*N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-amine) achiral, wie die meisten PAS-Liganden (Scheuermann *et al.* 2015). Die Besetzung der HIF-2 α -PAS-B-Domäne durch die neuen, chiralen Liganden führt nach Scheuermann *et al.* zu größeren Konformationsänderungen in dieser Domäne im Vergleich zu den früher untersuchten Verbindungen.

2. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Förster-(Fluoreszenz)-Resonanz-Energietransfer (FRET) zum Nachweis der Interaktionen zwischen den Untereinheiten von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) mittels der konfokalen Lasermikroskopie gemessen werden. Die Messungen wurden in lebenden humanen Osteosarkomzellen (Knochentumorzellen) U2OS durchgeführt. Für die Detektion des FRETs wurde das Fluorophorpaar ECFP (*enhanced cyano fluorescence protein*) und EYFP (*yellow fluorescence protein*) verwendet. Zur Untersuchung einer Interaktion zwischen zwei HIF-Proteinen wurde das eine Protein an ECFP und das andere an EYFP gekoppelt.

Eines der Ziele war, die inhibierende Wirkung der Substanz *N*-(3-Chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-amine (vgl. Scheuermann *et al.* 2013; Produktname HIF-2 Antagonist 2) auf die Heterodimerisierung des Transkriptionskomplexes HIF-2 α / ARNT in U2OS-Zellen zu überprüfen.

Zum Vergleich sollte auch der Einfluss des HIF-2 α -Antagonisten auf den Transkriptionskomplex HIF-1 α / ARNT mit Hilfe von FRET-Messungen untersucht werden. Zusätzlich galt es, mittels der konfokalen Lasermikroskopie zu bestimmen, ob eine Interaktion zwischen den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-2 α sowie HIF-2 α und HIF-2 α stattfindet.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen musste eine Mutation in der Nukleotidsequenz, die für die PAS-A-Domäne der HIF-2 α -Untereinheit codiert, beseitigt werden. Außerdem waren in die Nukleotidsequenzen CFP-HIF-2 α und YFP-HIF-2 α eine Aminosäure sowie ein Stopcodon einzubauen. Da Punktmutationen in der HIF-2 α -Untereinheit, besonders in der PAS-Region, die Interaktion mit ARNT stark beeinflussen können, wurden auch mutierte Proteine für die FRET-Messungen verwendet.

Als zweite Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde die sogenannte Co-Immunpräzipitation gewählt.

Zusätzlich wurde die Expression der Zielgene von HIF-1 α und HIF-2 α analysiert.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellmaterial

Tab. 3-1 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung
U2OS ATCC® HTB-96™	Osteosarkom, <i>Homo sapiens</i> , adhärente Zellkultur epithelialen Ursprungs aus Knochengewebe

3.1.2. Bakterien

Tab. 3-2 Bakterien

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
Top10	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	ThermoFischer Scientific
XL10-Gold	<i>Tet^rΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Cam^r]</i>	Stratagene

3.1.3. Plasmide

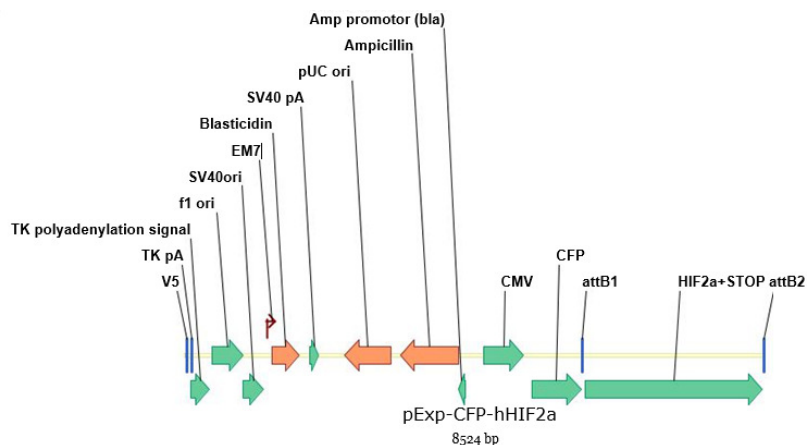
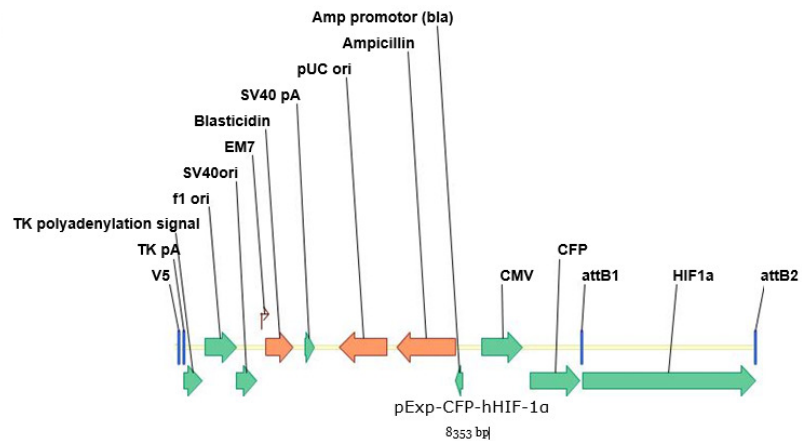
Für die Messungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers wurden CFP- bzw. YFP-gekoppelte Expressionsplasmide verwendet, die von Dr. rer. nat. Rebecca Konietzny mit dem Klonierungssystem *Gateway* kloniert worden sind (vgl. Tab. 3-3, Zeilen 4-8). Für die Co-Immunpräzipitation wurden CFP-, GAL4- und HA-gekoppelte Plasmide verwendet (vgl. Tab. 3-3). Das Gal4-fusionierte HIF-2α-Plasmid wurde von O'Rourke *et al.* 1998 kloniert und enthielt eine GAL4-DNA-Bindedomäne (Aminosäure-Sequenz 1-147) und die HIF-2α-

3. Material und Methoden

Sequenz (19-870 AS). Für diese Arbeit wurden die GAL4- und HA-gekoppelten Plasmide von Prof. Dr. med. Eric Metzen zur Verfügung gestellt.

Tab. 3-3 Plasmide

Plasmid	Ursprung
pcDNA 6.2 N / YFP-DEST	ThermoFisher Scientific
pcDNA 6.2 N / CFP-DEST	ThermoFisher Scientific
pExp-CFP-HIF-1 α	Ausgangsprodukt: HIF-1 α (<i>Biosystems, Clone ID 6151</i>)
pExp-CFP-HIF-2 α pExp-YFP-HIF-2 α	Ausgangsprodukt: EPAS1 (HIF-2 α) (von Bruick R. K.)



pExp-CFP-HIF-2 α Δ PAS	<p>Ampicillin Amp promoter (bla) pUC ori Blastidicin EM7 SV40 ori f1 ori TK polyadenylation signal TK pA V5 CMV CFP attB1 HIF2α ΔPAS attB2 pExp-CFP-hHIF2α ΔPAS 7741 bp</p>
pExp-CFP-HIF-2 α PAS-Bm.	<p>Ampicillin Amp promoter (bla) pUC ori Blastidicin EM7 SV40 ori f1 ori TK polyadenylation signal TK pA V5 CMV CFP attB1 HIF2α PAS-Bm. attB2 pExp-CFP-hHIF2α PAS-Bm. 8524 bp</p>
pExp-YFP-ARNT	<p>Ausgangsprodukt: ARNT (ThermoFisher Scientific, Clone ID IOH36815)</p> <p>SV40 pA Blastidicin EM7 SV40 ori f1 ori TK polyadenylation signal TK pA V5 Ampicillin ori CMV YFP attB1 Kozak consensus sequence hARNT attB2 pExp-YFP-hARNT 8247 bp</p>
GAL4-HIF-2 α	Ausgangsprodukt: EPAS1 (19-870 AS), mit GAL4 N-terminal fusioniert
HA-HIF-1 α - pcDNA3	Addgene, HA-Tag N-terminal
HA-HIF-2 α - pcDNA3	Addgene, HA-Tag N-terminal

3.1.4. Chemikalien und Kits

In dieser Arbeit wurden Chemikalien der Firmen *Bio-Rad*, *Roche*, *Roth*, *Sigma-Aldrich*, und *ThermoFisher* verwendet.

Tab. 3-4 Kits

Kit	Hersteller
GeneJET Plasmid Miniprep	ThermoFisher Scientific
Pure Yield Plasmid Midiprep	Promega
SuperSignal West Femto Maximum sensitivity substrate	ThermoFisher Scientific

3.1.5. Geräte

Tab. 3-5 Geräte

Gerät	Firma
Analysewaage SAE 200	Bosch
Autoklav, Varioklav	H + P Labortechnik GmbH
Brutschrank, Hera cell	Heraeus Instruments
Eis-Aufbereitungsmaschine AF 10	Scotsman
Elektrophoresesystem	BioRad / hausinterne Werkstatt
Heizblocke 60°C: HLC TM 130-6,95°C: HLC HTM 130	Oehmen
Hypoxie-Brutschrank	Heraeus Instruments
Kühlzentrifugen	Eppendorf
Centrifuge 5415 R, Biofuge fresco, Labofuge 400 R	Heraeus Instruments
Lichtmikroskop, CK40	Olympus
pH-Meter	Precisa
Pipettierhilfe	Hirschmann
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments
Sterilwerkbank, Hera safe	Heraeus Instruments
Tischzentrifugen	Eppendorf

Mastercycler personal, Tpersonal, Tprofessional	Biometra
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad, GFL	Oehmen
Western-Blot, Mini Protean 3	Bio-Rad

3.2.Methoden

3.2.1. Methoden für die Zellkultur

3.2.1.1. Subkultivierung einer Monolayerkultur

In dieser Arbeit wurden humane Osteosarkomzellen U2OS verwendet, die als Monolayerkulturen adhärent auf dem Boden der Kulturgefäße bei 37 °C und 5 % CO₂ wachsen. Die Zelllinien wurden in 75cm²-Zellkulturflaschen (*Cellstar*®) im DMEM-Medium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) kultiviert, das mit 10 % FCS (*Fetal Calf Serum*), 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin (*Gibco*) versetzt wurde.

Bei 80-90%igem Bewuchs der Zellkulturflasche mit Zellen wurden die Zellen aus dem Monolayer enzymatisch herausgelöst und mit frischem DMEM-Medium verdünnt. Dafür wurden die Zellen mit 2 ml der sterilen 1%igen PBS-Lösung (*Cambrex*) gewaschen und mit 1 ml 10%iger Trypsin-Lösung (*Gibco*) versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellkulturflasche im Brutschrank für 2-3 min. Nach der Inkubation wurden die Zellen im frischen DMEM-Medium resuspendiert. Anschließend wurde das benötigte Volumen der resuspendierten Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem DMEM-Medium überführt. Das Medium wurde nach 2-3 Tagen gewechselt.

Die Arbeit mit den Zellkulturen erfolgte unter der Sterilwerkbank (*Heraeus Instruments*), um Kontaminationen der Zellen mit Bakterien, Pilzen und Viren zu vermeiden. Dafür wurden die Sterilwerkbank sowie alle verwendeten Medien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien mit Terralin (*Schülke*) desinfiziert. Vor Beginn der Experimente wurden das Medium und die Lösungen bei 37 °C im Wasserbad (*Oehmen*) erwärmt.

3.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde die Zählkammer mit der Zellsuspension befüllt, indem die Pipette an die Kante der Zählkammer angesetzt und die Zellsuspension durch Kapillarkräfte angesaugt wurde. Ein Über- und Unterfüllen der Zählkammer wurde vermieden, um die Zellzahl nicht zu verfälschen. Die Zellen wurden aus fünf kleinen Quadraten des großen Zählkammer-Quadrats gezählt. Die vier kleinen auszuzählenden Quadrate lagen auf einer Diagonale und das fünfte Quadrat in der Ecke.

3.2.1.3. Transiente Transfektion

Unter einer Transfektion wird das Einbringen einer Fremd-DNA in eukaryotische Zellen verstanden (Teifel 2012). Bei einer transienten Transfektion integriert die Fremd-DNA nicht in das Genom der Zielzelle, sondern bleibt nur für einen begrenzten Zeitraum in der Zielzelle. Dadurch wird das gewünschte Protein nur für kurze Zeit (48-72 h) in der Wirtszelle exprimiert. In dieser Arbeit wurden humane Osteosarkomzellen U2OS transient transfiziert. Hierfür wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 60-70 % ausgesät. Es wurden 2×10^5 Zellen pro Glasboden-Schale für eine FRET-Messung und pro Well einer 6-Well-Platte für die Gesamt-RNA-Isolierung sowie einen Westernblot-Versuch ausgesät. Für die Durchführung eines Co-Immunpräzipitations-Versuchs wurden 7×10^5 Zellen pro 60mm-Petrischale ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion. Die Transfektion wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *ViaFect*TM (*Promega*) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. Isolierung der Gesamt-RNA mit Phenol-Chlorophorm

Zur Bestimmung der Hypoxie-induzierbaren Genexpression wurde die mRNA aus den U2OS-Zellen isoliert. Für die Isolierung der mRNA wurden die Zellen in 6-well-Platten kultiviert, wobei pro Well 2×10^5 Zellen ausplattiert wurden. Die Zellen wurden 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die U2OS-Zellen unter hypoxischen Bedingungen, bei 1 % O₂ für 6 h inkubiert.

Zur Isolierung der mRNA wurde das Nährmedium auf Eis entfernt, die Zellen mit kalter PBS-Lösung gewaschen und danach mit 700 µl GTC (Guanidinthiocyanat) versetzt. Anschließend wurden die Zellen bei -20 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgten alle Schritte der RNA-Isolierung unter dem Abzug. Die Zellen wurden aufgetaut, mit 70 µl Natriumacetat angesäuert und in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt. Danach wurden 500 µl Phenol (*AppliChem*) und 350 µl Phenol-Chlorophorm (*AppliChem*) zugegeben. Des Weiteren erfolgte eine Inkubation für 20-30 min auf Eis mit der darauffolgenden Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 13 000 rpm. Die Zentrifugation führte zur Bildung von zwei Phasen, der organischen (unten) und flüssigen (oben). In der organischen Phase befinden sich Proteine und in der flüssigen RNA. Die obere Phase wurde abgenommen und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt, in die 600 µl Isopropanol (*CARLO ERBR*) vorgelegt wurden. Die RNA wurde über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die RNA-Proben unter dem Abzug bei 4 °C und 13 000 rpm für 30 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben wurden unter dem Abzug getrocknet. Danach wurden 350 µl GTC und 500 µl Isopropanol hinzugegeben und auf einem Wirbelmischer gemischt. Als Nächstes erfolgte wieder eine Inkubation bei -20 °C über Nacht. Am dritten Tag der RNA-Isolierung wurden die mRNA-Proben bei 4 °C und 13 000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment getrocknet. Danach wurden 500 µl 75%iges Ethanol (verdünnt mit DEPC-Wasser) zu den Proben hinzugegeben. Die Proben wurden auf einem Wirbelmischer gemischt, 15 min bei RT inkubiert und für 30 min bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugiert. Des Weiteren wurde der Überstand vorsichtig verworfen und die Sedimente wurden bei RT getrocknet, bis keine Ethanolreste mehr zu sehen waren. Je nach Größe der Sedimente wurden diese in 10-25 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mit Hilfe des Photometers *Epoch Reader* (*BioTek*) bestimmt.

3.2.2.2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Reverse Transkription wurde 1 µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Folgende Reagenzien wurden für die Umschreibung der isolierten Gesamt-RNA in cDNA verwendet: Oligo-dT-Nukleotide, das Enzym Reverse Transkriptase MMLV-RT (*Promega*), der 5x Reverse Transkriptase-Puffer (*Promega*) und vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (*Promega*).

Oligo-dT-Nukleotide fungieren als Primer, die an den Polyadenylierungschwanz der RNA binden. Für die Katalyse der cDNA-Synthese mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird ein freies 3'-OH durch die Oligo-dT-Nukleotide zur Verfügung gestellt. Somit kann der DNA-Strang synthetisiert werden, der zum RNA-Strang komplementär ist.

Es wurden folgende Ansätze in 0,5-ml Reaktionsgefäßen auf Eis vorbereitet:

Tab. 3-6 Pipettieransätze für die Reverse Transkription

Ansatz 1 (Gesamtvolumen 12 µl)	Ansatz 2 (Gesamtvolumen 13 µl)
x µl (1 µg) Gesamt-RNA	5 µl 5x Reverse Transkriptase-Puffer
2,5 µl Oligo-dT-Nukleotide	5 µl dNTPs
x µl RNase-freies dest. Wasser	0,5 µl MMLV-RT
	2,5 µl RNase-freies dest. Wasser

Der Ansatz 1 wurde auf einem Wirbelmischer gemischt und danach kurz anzentrifugiert. Des Weiteren wurde der Ansatz 1 bei 68 °C 10 min und danach 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 2 dazu gegeben und das Programm für die Reverse Transkription gestartet.

Die cDNA-Synthese wurde wie folgt durchgeführt:

Tab. 3-7 Programm für die Reverse Transkription

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1×	45	90
1×	52	30
1×	95	15

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona 1987) ist eine Methode zur Amplifikation spezieller doppelsträngiger DNA. Für die Reaktion werden eine Template-DNA (Ausgangs-DNA), eine hitzestabile DNA-Polymerase, vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP, dTTP und zwei Oligonukleotid-Primer, die das DNA-Fragment flankieren, benötigt. Der eine Primer ist komplementär zum Leit- und der andere zum Folgestrang.

Der PCR-Zyklus beginnt mit der Trennung der zwei DNA-Stränge (Denaturierung) durch Erhitzen. Danach erfolgt die Abkühlung der Reaktionsmischung, die die Anlagerung der beiden Oligonukleotid-Primer an die komplementären DNA-Stränge erlaubt. Anschließend fügt die DNA-Polymerase die dNTPs an die beiden DNA-Stränge an und synthetisiert damit zwei neue Doppelstränge. Die zwei neuen Doppelstränge dienen bei dem nächsten Zyklus als Template-DNA. Die PCR-Reaktion läuft in einem PCR-Cycler ab und umfasst mehrere Zyklen, bei denen eine exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA erfolgt.

In dieser Arbeit wurde die Reaktion durch die DNA-Polymerase *GoTaq* (*Promega*) katalysiert. Der folgende Ansatz wurde in 200 µl-Gefäße pipettiert:

Tab. 3-8 Pipettieransatz für die PCR

5 µl 5× <i>GoTaq</i> buffer
2 µl dNTPs
1 µl Primer-Mix (je 0.5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer)
16.5 µl H ₂ O
0.05 µl <i>GoTaq</i> Polymerase

Zu dem Ansatz wurde 0,5 µl cDNA hinzugegeben und die PCR-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Tab. 3-9 Amplifikation eines Zielgens

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1×	96	3
30×	96	1
	60	1,5
	72	3
1×	72	10

Außerdem wurde das für das Protein β -Aktin kodierende Gen mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikation von β -Aktin diente als Kontrolle der erfolgreichen Reversen Transkription der isolierten Gesamt-RNA.

Die PCR von β -Aktin wurde wie folgt durchgeführt:

Tab. 3-10 Amplifikation von β -Aktin

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1×	96	3
25×	96	1
	60	1,5
	72	3
1×	72	10

3.2.2.4. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente aus der PCR wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet (Sambrook *et al.* 1989). Dabei wandern die DNA-Fragmente im Agarosegel von Kathode zu Anode, weil sie negativ geladene Phosphatreste enthalten. Die DNA-Fragmente werden entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die PCR-Produkte wurden auf das 1%ige Agarosegel aufgetragen, das die Substanz Ethidiumbromid (*AppliChem*) enthielt. Ethidiumbromid ist ein Fluorophor, das zwischen die Basen der DNA interkaliert und damit die auf das Agarosegel aufgetragenen DNA-Fragmente nach der Anregung mit UV-Licht sichtbar macht.

Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe von *BioDoc-ItTM Imaging System (UVB)*.

3.2.2.5. Relative mRNA-Bestimmung mittels *Real-time*-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der *Real-time*-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde der Unterschied in der Expression einer mRNA-Sequenz in der zu untersuchenden Probe relativ zur Expression der mRNA in der Kontrollprobe quantifiziert. Die aus der Gesamt-RNA synthetisierte cDNA wurde als *Template* für eine RT-PCR verwendet. Für die Durchführung der RT-PCR wurde das Kit *qPCR MasterMix[®] Plus SYBR[®] Green RT-PCR (Eurogentec)* verwendet.

Zur Bestimmung des zu untersuchenden Transkripts wurde ein spezifisches Primerpaar (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) benutzt. Zum Vergleich wurde die Expression eines *house keeping gene* bestimmt. Das Expressionslevel von *house keeping gene* diente als Referenz. Als Negativkontrolle wurde für jedes Primerpaar ein Ansatz ohne cDNA gemacht.

3. Material und Methoden

Die Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von jeweils 10 µl und setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Tab. 3-11 Pipettieransatz für die RT-PCR

12,5 µl <i>SYBR-Green</i> Master-Mix
1 µl Primer-Mix (je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer)
11 µl dest. Wasser
0,5 µl cDNA

Die Ansätze wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert, danach wurde die Platte mit einer Klebefolie gedeckt und für 1 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde die RT-PCR in einem *Real-Time Thermocycler* durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Schmelzkurve aufgenommen.

Die in der Tab. 3-12 aufgeführten Primer wurden für die RT-PCR verwendet.

Tab. 3-12 Primer für die RT-PCR

Gen	Name	Sequenz 5' → 3'
β-Aktin	hactin 5'	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA
	hactin 3'	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
CA-IX	hCA-IX 5'	CACGTGGTTCACCTCAGCAC
	hCA-IX 3'	CAGCGATTTCTTCCAAGCG
PAI-1	hPAI-1 5'	GACCGCAACGTGGTTTTCTC
	hPAI-1 3'	CCTTGTACAGATGCCGGAGG

3.2.2.6. Bakterientransformation

Unter der Bakterientransformation wird eine Aufnahme einer Plasmid-DNA in kompetente Bakterien zur Vervielfältigung der im Plasmid enthaltenen genetischen Information verstanden. Die kompetenten Bakterien wurden nach der Hitzeschock-Methode (Sambrook *et al.* 1989) transformiert. Der Hitzeschock führt dazu, dass die Zellwand der kompetenten Bakterien porös und somit die fremde Plasmid-DNA aufgenommen wird.

In dieser Arbeit wurden folgende Stämme des Bakterientyps *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet: Top10 (*Thermo Scientific*TM) und XL10-Gold (*Stratagene*).

Für die Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und 0,1-0,5 µg des gewünschten Plasmids zu den Bakterien hinzugegeben. Nach der 30minütigen Inkubation der Bakterien auf Eis wurde der Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C auf einem Heizblock durchgeführt. Als Nächstes wurden die Bakterien für 2 min auf Eis inkubiert, danach mit 250 µl SOC-Medium (*Invitrogen*) versetzt und für ca. 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl der gewachsenen Bakterien auf eine ampicillinhaltige LB-Platte mit einem sterilen Spatel ausplattiert und in einem Bakterieninkubator bei 37 °C über Nacht inkubiert. War die Transformation erfolgreich, konnten am nächsten Tag Bakterienkolonien auf der LB-Platte identifiziert werden. Die LB-Platten wurden auf Dauer bei 4 °C aufbewahrt. Die Petrischalen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Tab. 3-13 Zusammensetzung des LB-Festagars

LB-Festagar	3,5 g Difco Antibiotic Medium 3 3 g Select Agar auf 200 ml mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen autoklavieren die Lösung abkühlen 200 µl Antibiotikum-Lösung (10 mg / ml) hinzugeben verteilen: 20 ml je 94 mm-Kulturschale
-------------	--

3.2.2.7. Plasmid-Isolierung

Eine Kolonie der transformierten Zellen wurde mit einer Pipettenspitze von der LB-Platte abgenommen und zusammen mit der Pipettenspitze in ein steriles Falcongefäß, in dem 10 ml LB-Medium mit 10 µl (100 µg/ml) des Antibiotikums Ampicillin (*Calbiochem*) enthalten waren, zugegeben. Die Kultur wurde in einem Schüttler über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die gewachsene Bakterienkultur in einen 200ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium unter der Sterilwerkbank gegossen und wieder über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Aus der 100ml-Bakterienkultur erfolgte die Isolierung der gewünschten Plasmid-DNA mit Hilfe des Kits *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (*Promega*) genau nach den Herstellerangaben.

Tab. 3-14 Zusammensetzung des LB-Mediums

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Natriumchlorid 5 g Hefeextrakt auf 1 l mit <i>Aqua dest.</i> auffüllen autoklavieren
-----------	---

3.2.2.8. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA sowie Plasmid-DNA wurde photometrisch mit Hilfe von *Epoch Reader* (*Biotek*) nach dem Lambert-Beer-Gesetz bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde nach dem Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm zu 280 nm beurteilt. Das Absorptions-Verhältnis A_{260} / A_{280} sollte im Idealfall 1,8-2,0 betragen.

3.2.2.9. Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden in der Firma *Seqlab* (Göttingen) sequenziert. Hierfür wurden folgende Sequenzierungsprimer verwendet (vgl. Tab. 3-15).

Tab. 3-15 Sequenzierungs-Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'
EGFP-C for	5' GTCCTGCTGGAGTTCGTG
CMV for	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EGFP-N-rev (Standard)	3' GCTTGCCGTAGGTGGCATC
HIF-1 α	5' TTTTCTCAGAATGAAGTGTAC 5' CAGATATGAAAATGACTCAGC 5' CAATGGATGATGACTTCCAG 5' GGAGCAAAAGACAATTATTTTAA 3' TAGCTGCATGATCGTCTGGC 3' ATGGGTTCTTTGCTTCTGTG 3' AGTCGTGCTGAATAATACCAC 3' TGTAAGCATTTCTCTCATTTTC
HIF-2 α	5' ACCAGCAGATGGACAACCTTGTA 5' TTGATAGCAGTGGCAAGGGG 5' CACCGGCCCCATGTCCTCC 3' ATGTCTCAGGGGATGGCCC 3' CAGTGGCTGGAAGATGTTTGT 3' ATGCTGTTCATGGCCATCAGG
ARNT	5' TGATCTTGGAGGCAGCAGA 5' ACAACATTGAGGGTATCTTCA 5' ATCAGAGTAAAGGCATCTCCT 5' TGGGCAGCTTTCAGACTCC 3' AATTGTCCTGCAGTCTGTCCAG 3' TACCATGTCCAATTCTGTTTGC 3' TTGATGTAGCCTGTGCAGTGGAC 3' CAGTTCTGTGATGTAGGCTG

3.2.2.10. Ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese können gezielt gewünschte Mutationen in eine DNA-Nukleotidsequenz eingeführt werden (Alberts *et al.* 2012). Die Methode wird oft angewandt, um bestimmte Aminosäuren in der Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins auszutauschen. Dadurch kann die Bedeutung dieser Aminosäuren für die Funktion des Proteins untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde die ortsspezifische Mutagenese zur Korrektur einer zufällig aufgetretenen Mutation und Deletion in der proteincodierenden Nukleotidsequenz der HIF-2 α -Untereinheit angewandt. Die Expressionsplasmide pExp-CFP-HIF-2 α , pExp-YFP-HIF-2 α , pExp-CFP-HIF-2 α Δ bHLH sowie pExp-YFP-HIF-2 α PAS-B-Mutante enthielten die Nukleobase Adenin statt Guanin an der Position 413 in der für die HIF-2 α -Untereinheit codierenden Nukleotidsequenz. Bei den Fusionsplasmiden pExp-CFP-HIF-2 α und pExp-YFP-HIF-2 α fehlte außerdem in der Nukleotidsequenz ein Triplett ACC (ein Adenin an der Position 2608 und zwei Cytosine an den Positionen 2609 und 2610) sowie der Stopcodon TGA. Das Triplett ACC codiert für die Aminosäure Threonin, die die letzte Aminosäure in der HIF-2 α -Aminosäuresequenz ist.

Um die Punktmutation zu beheben sowie die fehlenden Nukleobasen und den Stopcodon in die Nukleotidsequenz einzubauen, wurden zwei Primer-Paare designt, die zur Vervielfältigung der korrekten DNA-Sequenz in zwei Polymeraseketten-Reaktionen (PCR) eingesetzt wurden. Das Primer-Design erfolgte nach den Regeln, die in dem Artikel von Zheng *et al.* beschrieben wurden (Zheng *et al.* 2004). Das eine Primer-Paar diente der Korrektur der Punktmutation an der Position 413 in der proteincodierenden HIF-2 α -Nukleotidsequenz und wurde in der ersten PCR eingesetzt. Die Nukleotidsequenz des Vorwärts-Primers enthielt die Nukleobase Guanin (G, rot markiert), die das Adenin ersetzen sollte. Der Rückwärts-Primer enthielt dementsprechend die Nukleobase Cytosin (C, rot markiert) (vgl. Tab. 3-16, das erste Primer-Paar).

Das andere Primer-Paar diente dem Einfügen der fehlenden Aminosäure an der Position 870 sowie des Stopcodons und wurde in der zweiten PCR verwendet (vgl. Tab. 3-16, das zweite Primer-Paar). Es wurden die Nukleobasen Cytosin, Thymin (T) und Adenin (rot markiert) mit Hilfe des Vorwärts-Primers in die Nukleotidsequenz der HIF-2 α -Untereinheit insertiert. Durch den Einbau von Thymin und Adenin entstand der Stopcodon TGA. Dabei entstand in der Nukleotidsequenz eine stille Mutation, weil aus dem für das Thr870 codierenden Triplett ACC das Triplett ACG wurde. Das Triplett ACG codiert ebenfalls für die Aminosäure Threonin und

3. Material und Methoden

die Präsenz der Nukleobase Guanin anstelle von Cytosin hat keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des HIF-2 α -Proteins.

Der Rückwärts-Primer enthielt an den entsprechenden Positionen Tyrosin, Adenin und Guanin.

Die Aminosäure Threonin entsteht bei der Translation des Triplets ACG und der Stopcodon bei der Translation des Triplets TGA.

Tab. 3-16 Primer für die ortsspezifische Mutagenese

Primer-Paar	Sequenz 5' → 3'
vorwärts	TCACTCATCCCTGCGACCATGAGGAGATTCG
rückwärts	CTCATGGTCGCAGGGATGAGTGAAGTCAAAGATACTATG
vorwärts	TGGACCAGGCCACGTGAGGGCGCGCCGACCCAGC
rückwärts	CGGCGCGCCCTCACGTGGCCTGGTCCAGGGCTCTG

Für die Durchführung einer PCR-Reaktion wurde folgender PCR-Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 25 μ l wurde zusammen pipettiert:

Tab. 3-17 PCR-Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese

2,5 μ l 10 \times Pfu-Puffer mit MgSO ₄
10 μ M Vorwärts-Primer
10 μ M Rückwärts-Primer
200 μ M dNTP
0,25 % v/v DMSO
100 ng DNA-Template
1 μ l Pfu-DNA-Polymerase

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Tab. 3-18 PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese

Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in min
1	95	3
20	95	1
	52	1
	68	1 pro ½ Kb
1	68	60

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit Hilfe der horizontalen Agarosegel-Elektrophorese (vgl. Abschn. 3.2.2.4) aufgetrennt, um zu sehen, ob das 8524 bp-große DNA-Molekül durch die PCR amplifiziert werden konnte. Dabei wurde die DNA auf ein 0,5%iges Agarosegel aufgetragen. Wie in Abschn. 3.2.2.3 beschrieben, wird in einer PCR-Reaktion eine *Template*-DNA (Ausgangs-DNA) exponentiell amplifiziert. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-DNA wurden zunächst in Bakterien transferiert und danach aus den Bakterien isoliert. Bakterien modifizieren Fremd-DNA, indem sie diese mit Hilfe der Methyltransferasen an bestimmten Nukleobasen methylieren. Dabei bleibt das Grundgerüst der Nukleobasen unverändert. Die sog. Desoxyadenosinmethylasen bauen eine Methylgruppe an Adenin in der GATC-Sequenz einer DNA ein. Die methylierte DNA wird in Bakterien viel besser exprimiert. Um die stärkere Expression der nicht korrigierten Ausgangs-DNA, die in der PCR-Probe noch vorhanden war, zu vermeiden, erfolgte zunächst der Restriktionsverdau des PCR-Produkts mit dem Enzym Dpn I. Dpn I ist eine Restriktionsendonuklease, die Methylgruppen an den GATC-Stellen in der DNA-Sequenz spaltet (vgl. Abb. 3-1).

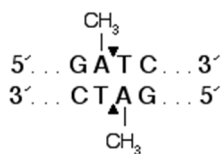


Abb. 3-1 Restriktionsverdau durch Dpn I.

Hier wurde das Enzym Dpn I und der für den Restriktionsverdau verwendete *CutSmart*-Puffer von der Firma *New England Biolabs* bezogen. 1 U (Unit) des Enzyms verdaut 1 µg der Dam-methylierten pBR322-DNA in 1 h bei 37 °C.

Folgender Restriktionsansatz wurde pipettiert (vgl. Tab. 3-19):

Tab. 3-19 Restriktionsansatz mit Dpn I

3 µg PCR-Produkt
1x CutSmart-Puffer
3 U Dpn I

Um die Verdau-Wahrscheinlichkeit des gesamten PCR-Produkts zu erhöhen, wurde der Restriktionsansatz 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach der 4stündigen Inkubation erfolgte die Inaktivierung der Wirkung des Enzyms durch die 20minütige Inkubation bei 80 °C.

Danach wurde die Transformation des PCR-Produkts in Bakterien (vgl. Abschn. 3.2.2.6) durchgeführt.

3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1. Proteinisolierung aus Monolayer-Kulturen

Die Isolierung der Proteine aus den Monolayerkulturen erfolgte auf Eis. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit eiskalter 1x PBS-Lösung gewaschen. Danach erfolgte der Zellaufschluss, indem pro Well einer 6-Well-Platte 50 µl und pro 60 mm-Petrischale 300 µl eines Lysepuffers pipettiert wurde. Dabei wurden für den Westernblot und die Co-Immunpräzipitationsanalyse (Co-IP) unterschiedliche Lyse-Puffer verwendet (vgl. Tab. 3-20 und Tab. 3-21). Die 6-Well-Platten bzw 60mm- Petrischalen wurden vorsichtig für die Verteilung des Lysepuffers geschwenkt, die Zellsuspensionen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Petrischalen entfernt und in 1,5ml-Eppendorfgefäße überführt. Die Proben wurden mindestens 20 min auf Eis inkubiert und danach bei 3,6 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C aufbewahrt. Dabei wurden je 5 µl für die Bestimmung der Proteinkonzentration von den Überständen genommen.

Tab. 3-20 Zusammensetzung des Lyse-Puffer für Westernblot

Lysepuffer für Westernblot	0,1 % Igepal 0,3 M NaCl 10 mM Tris, pH 7,9 1 mM EDTA 18,9 ml 1x PBS
----------------------------	---

Tab. 3-21 Zusammensetzung der Puffer für die Co-IP

Lysepuffer für Co-IP mit GAL4-Antikörper-Agarose-Konjugat, pH 7,2	1 % NP40 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 10 mM Na ₃ PO ₄ 10 % Protease-Inhibitor
Lyse-Puffer für Co-IP mit (<i>GFP-Trap_MA</i>)	10 mM Tris/Cl pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,5 % NP-40 0,1 % SDS 1 % Triton X-100 1 % Deoxycholat 1 mM PMSF 10 % Protease-Inhibitor
Wasch-Puffer für Co-IP	10 mM Tris/Cl pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1 mM PMSF

3.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben wurde ein *DC Protein Assay Kit (BioRad)* verwendet. 5 µl des Zelllysats wurden mit 45 µl Aqua dest. verdünnt. 20 µl der verdünnten Probe wurden pro Well einer 96-Well-Platte für eine Doppelbestimmung pipettiert. Zusätzlich wurde eine Standardreihe mit unterschiedlichen Albumin-Konzentrationen, 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1 mg/ml, auf die 96-Well-Platte sowie eine Leerwert-Probe (nur Wasser) aufgetragen. In jedes Well wurde 10 µl Reagenz A und 80 µl Reagenz B pipettiert. Nach Zugabe der Reagenzien wurde die 96-Well-Platte 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Emission bei 700 nm mit Hilfe von *Epoch Reader (Biotek)* gemessen.

3.2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophorese wird in der Bioanalytik zur Trennung von Proteinen oder anderen Biomolekülen verwendet. Bei dieser Methode wandern Ionen und Makromoleküle, die Ladungen tragen in einem elektrischen Feld durch Poren einer Gelmatrix. Hierbei sind kleine Moleküle bei gleicher Ladungsdichte elektrophoretisch mobiler als große. Große Moleküle bleiben in den Poren hängen und diffundieren langsamer.

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsteht die Gelmatrix aufgrund der Polymerisation von Acrylamid und N, N'-Methylen-Bisacrylamids als Quervernetzer. Die Proteine werden bei dieser Art der Gelelektrophorese in denaturierter Form nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im Falle der SDS-PAGE (Laemmli 1970) wird als Denaturierungsmittel das Detergens Natriumdodecylsulfat verwendet. Das Detergens SDS (*engl.: sodium dodecyl sulfate*) unterbricht mit seiner langkettigen Alkylgruppe hydrophobe Interaktionen in Proteinen, wodurch die Quartär-, Tertiär- und Sekundär-Struktur der Proteine zerstört werden. Es entstehen Zufallsknäuel, in die sich die SDS-Kette mit ihrem hydrophoben Gerüst einlagert. Dabei zeigen die negativ geladenen Sulfatgruppen der SDS-Kette nach außen, wodurch die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Aufgrund dessen können die Proteine zum positiven Pol wandern und entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Bindung des Detergens erfolgt im Verhältnis 1,4 g SDS pro 1 g Protein (Voet *et al.* 2002). Für die SDS-PAGE wurden die bei -20 °C eingefrorenen Proben aufgetaut, auf einem Wirbelmischer gemischt und dann anzentrifugiert. Des Weiteren wurden die Proben mit dem

3. Material und Methoden

SDS-haltigen Probenpuffer (4× SDS-Puffer, vgl. Tab. 3-22) versetzt. Das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert Disulfid-Brücken (S-S-) in den Proteinen, wodurch die Sulfhydryl-Gruppen (SH-) gebildet werden. Damit trägt β -Mercaptoethanol zur Denaturierung der Proteine bei.

Tab. 3-22 Zusammensetzung des 4× SDS-Puffers für die SDS-PAGE

4× SDS-Puffer	100 mM Tris, pH 6,8 4 % SDS 10 % β -Mercaptoethanol 0,025 % Bromphenolblau 20 % Glycerin
---------------	--

Die Proben wurden auf einem Wirbelmischer gemischt und in einem Thermomixer bei 95 °C für 5 min unter Schütteln erhitzt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und zusammen mit einem Molekulargewichts-Standard (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific) auf ein frisch gegossenes, 7,5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde bei konstanter Spannung von 110 V für ca. 90 min durchgeführt.

Tab. 3-23 Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

7,5%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
5 mL H ₂ O	2,92 mL H ₂ O
2,5 mL Bis-Acrylamid	0,830 ml Bis-Acrylamid
2,5 mL 1.5 M TRIS pH 8.8	1,25 mL 0.5 M TRIS pH 6.8
100 μ L 10 % APS	50 μ L APS
10 μ L TEMED	5 μ L TEMED

3.2.3.4. Westernblot

Zur gezielten Detektion der gewünschten Proteine wurden Westernblots durchgeführt. Westernblot ist eine Methode, die 1979 in der Arbeitsgruppe von Prof. George R. Stark entwickelt wurde (Renart *et al.* 1979) und seitdem zu den Standardmethoden in der Proteinbiochemie gehört. Beim Westernblot erfolgt eine Übertragung der Proteine von einem SDS-Gel oder nativen Gel auf eine immobilisierende Membran mittels Elektrophorese. Es gibt unterschiedliche Blot-Membranen, die Proteine entweder durch hydrophobe Wechselwirkungen wie z. B. Nitrozellulose oder hydrophobe und ionische Wechselwirkungen wie z. B. ⁺Nylon binden können. In dieser Arbeit wurde die Nitrozellulose-Membran *Protran BA85* der Firma *Whatman* mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet.

Für den Transfer der Proteine wurde ein *Sandwich*-Blot zusammengestellt, indem auf eine Gelhalter-Kassette folgende Komponenten in der unten angegebenen Reihenfolge gelegt wurden:

1 Fiberglasschwamm

1 Filterpapier

SDS-Gel

Nitrozellulose-Membran

1 Filterpapier

1 Fiberglasschwamm

Alle Bestandteile des Blot-*Sandwichs* wurden in ein Transferpuffer (15 g Tris, 72 g Glycin, 1 l Methanol, aufgefüllt mit *Aqua dest.* auf 5 l) getränkt. Das Methanol dient der Aktivierung der Proteinbindungsstellen.

Das Blotting wurde in einer Tank-Blot-Apparatur durchgeführt, die mit ca. 800 ml des Transferpuffers gefüllt war. Geblottet wurde bei 4 °C und konstanter Spannung von 110 V für 1,5 h. Dabei war die Nitrozellulose-Membran zur Anode und das SDS-Gel zur Kathode orientiert.

Nach dem Blotting wurde zur Verifikation des erfolgreichen Proteintransfers die Nitrozellulose-Membran in 0,1%iger Ponceau S - Lösung auf einem Rotierer bei 100 rpm und RT für 5 min inkubiert. Ponceaurot färbt reversibel Proteine auf Blot-Membranen und hat eine untere Nachweisgrenze von ca. 50 ng / Bande (Li *et al.* 1989). Die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure dient der Fixierung von Proteinen auf der Membran.

Danach wurde die Membran zweimal mit *Aqua dest.* gewaschen und zur Entfärbung der Proteine mit 1x TBST-Puffer mit 0,05 % Tween 20 für ca. 5 min unter Schütteln inkubiert.

Vor der Immunodetektion der gewünschten Proteine werden freie Proteinbindungsstellen auf Blot-Membranen mit Hilfe eines Blockmittels abgesättigt. In dieser Arbeit wurde eine 5%ige Magermilchpulver-Lösung oder 5%ige BSA-Lösung (*bovine serum albumine*) als Blockmittel verwendet, wobei beide Substanzen in 1x TBST-Puffer mit 0,05 % Tween 20 gelöst wurden. Zum Blocken wurden die Nitrozellulose-Membranen mit transferierten Proteinen in 5%iger BSA- oder Magermilchpulver-Lösungen für 1h bei RT auf einem Rollen-Mischgerät inkubiert.

3.2.3.5. Immundetektion

Das Prinzip der Immundetektion basiert auf der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Das gewünschte Protein repräsentiert ein Antigen, an das der primäre Antikörper bindet. Der sekundäre Antikörper erkennt den primären Antikörper und bindet diesen. Zur Visualisierung dieser Bindung ist der sekundäre Antikörper entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym gekoppelt, das eine Farb- oder Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert. In dieser Arbeit wurden sekundäre Antikörper verwendet, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert waren. Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, das dadurch angeregt wird. Danach fällt das Luminol in seinen Grundzustand zurück und emittiert dabei Licht der Wellenlänge von 425 nm.

Zur Detektion der gewünschten Proteine wurden zunächst die geblockten Nitrozellulose-Membranen mit primären Antikörpern bei 4 °C auf einem Rollen-Mischgerät über Nacht inkubiert. Die primären Antikörper wurden mit 5%iger Magermilchpulver-Blocklösung im Verhältnis 1:500 bzw. 1:1000 verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Membranen 5x für 3 min mit 1x TBST-Puffer mit 0,05 % Tween 20 gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern für 1 h auf dem Rollen-Mischgerät bei RT inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden in der Verdünnung 1:10000 eingesetzt.

Danach wurden die Blot-Membranen 3x für je 5 min in 1x TBST-Puffer mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Als Nächstes wurden die Blot-Membranen mit dem Reagenz *Lumi-Light^{Plus}* der Firma *Roche* (enthält Luminol) für 1 min inkubiert und anschließend die gewünschten Proteine mit Hilfe eines Lumineszenz-Imagers detektiert.

3. Material und Methoden

Als interner Standard der Proben wurde entweder die Expression des Proteins α -Tubulin oder die des β -Aktins bestimmt.

Nach der Detektion der zu untersuchenden Proteine wurden die Blot-Membranen für ca. 20 min mit 1x TBST-Puffer mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Danach wurden die Blot-Membranen mit einem sekundären Antikörper gegen β -Aktin oder α -Tubulin für 30 min auf einem Rollen-Mischgerät bei RT inkubiert. Anschließend wurde 5x für je 3 min in 1x TBST-Puffer mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Die Luminol-Reaktion und Detektion der Lumineszenz erfolgte wie oben beschrieben.

In dieser Arbeit wurden folgende Antikörper verwendet (vgl. Tab. 3-24):

Tab. 3-24 Antikörper

Antikörper	Erzeugung	Verdünnung	Hersteller
anti- β -Aktin	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-HA	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Sigma-Aldrich
anti-HIF-1 α	Maus, monoklonal	1:500	BD Biosciences
anti-HIF-2 α	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Novus
anti- α -GFP	Ratte, monoklonal	1:2000	ChromoTek
anti- α -Tubulin	Maus, monoklonal	1:500	Santa Cruz
anti-mouse	Ziege, HRP-konjugiert	1:10000	Sigma-Aldrich
anti-rabbit	Ziege, HRP-konjugiert	1:10000	Sigma-Aldrich

3.2.3.6. Co-Immupräzipitation

Die Methode der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*. Das Prinzip der Immunpräzipitation (IP) beruht auf der Antigen-Antikörper-Bindung. Das zu untersuchende Protein (Antigen) bindet an seinen spezifischen Antikörper, der an sog. *Agarose-Beads* gekoppelt ist. Die vernetzten Agarose-Moleküle dienen als Matrix für den Antigen-Antikörper-Komplex. Durch seine Bindung an die *Agarose-Beads* kann der Antigen-Antikörper-Komplex aus dem gesamten Proteingemisch isoliert werden. Interagiert das an seinen spezifischen Antikörper gebundene Protein mit einem anderen Protein, wird auch das andere Protein aus der gesamten Proteinmischung mitisoliert (Takahashi 2015). Durch Inkubation mit einem spezifisch gegen dieses interagierende Protein gerichteten Antikörper wird die Protein-Protein-Interaktion verifiziert.

Die hier durchgeführten Co-IP-Assays umfassten folgende Schritte: Isolierung der Proteine aus Zellen, Inkubation der Proteinproben mit Antikörper-gekoppelten Agarose-Beads, Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe mit Hilfe der SDS-PAGE (vgl. Abschn. 3.2.3.3) und Durchführung des Westernblots (vgl. Abschn. 3.2.3.4) mit anschließender Detektion der zu untersuchenden Proteine (vgl. Abschn. 3.2.3.5).

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung von Protein-Interaktionen zwei unterschiedliche Typen von *Agarose-Beads* verwendet. Der erste Typ der *Beads* (*Santa Cruz Biotechnology*) war mit einem Anti-Gal4-Antikörper gekoppelt und konnte Proteine binden, die mit dem Gal4-Protein fusioniert waren. Für die Co-IP-Analyse wurden $7 \cdot 10^5$ Zellen pro 60mm-Petrischale ausgesät und danach für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Des Weiteren wurden die Zellen mit je 5 µg des Gal4-fusionierten und HA-fusionierten Plasmids transfiziert und für 24-28 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Nächstes wurde das Nährmedium von den Petrischalen auf Eis entfernt und 500 µl des Lyse-Puffers hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Petrischalen entfernt und in 1,5ml-Eppendorfgefäße überführt. Nach der 20minütigen Inkubation der Zelllysate auf Eis wurden die Proteinproben abzentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 8 µl der *Agarose-Beads* zu den Proben hinzugegeben und die Proben bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotierer über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels der SDS-PAGE und danach die Durchführung des Westernblots mit anschließender Immundetektion.

Die anderen hier verwendeten *Agarose-Beads* (*GFP-Trap_MA*, *ChromoTek*) waren mit einem Anti-GFP-Antikörper gekoppelt und wiesen eine spezifische Affinität zu den Proteinen auf, die

mit dem Fluorophor GFP (*green fluorescent protein*) oder den GFP-Derivaten wie CFP (*cyan fluorescent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*) gekoppelt waren. Die Immunpräzipitation mit den Anti-GFP-Agarose-Beads wurde nach dem Protokoll des Herstellers (*ChromoTek*) bis auf einige Ausnahmen durchgeführt. Hier wurden $2 \cdot 10^5$ U2OS-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1 µg des CFP-markierten Fusionsproteins und 2 µg des HA-gekoppelten Fusionsproteins transfiziert. Nach 24 h konnte die Expression der CFP-markierten Proteine mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops bestätigt werden. Des Weiteren wurden die Zellen mit dem Lyse-Puffer lysiert und die gesamten Proteine aus den Zellen isoliert (vgl. Abschn. 3.2.3.1). Nach der Bestimmung der Protein-Konzentration wurde je Probe 4 µl Agarose-Beads verwendet. Die Proteinproben wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotierer inkubiert, so dass die CFP-Fusionskonstrukte aus dem gesamten Proteingemisch an die Beads binden konnten. Am nächsten Tag wurden die Agarose-Beads nach dem Protokoll des Herstellers behandelt. Das Eluat von den Beads wurde auf ein 7,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Folgende Protein-Protein-Interaktionen wurden analysiert: Gal4-HIF-2α / HA-HIF-1α, Gal4-HIF-2α / HA-HIF-2α, CFP-ARNT / HA-HIF-2α, CFP-HIF-2α / HA-HIF-2α und CFP-HIF-1α / HA-HIF-2α.

3.2.4. Konfokale Lasermikroskopie (Förster-Resonanz-Energietransfer)

3.2.4.1. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

In dieser Arbeit wurden Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen mittels der konfokalen Lasermikroskopie untersucht. Dabei wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET), auch als Förster-Resonanz-Energietransfer bezeichnet, zwischen den zu untersuchenden Proteinen gemessen. Mit Hilfe einer Perfusionskammer, die am Mikroskopisch befestigt wurde, konnten die Kultivierungsbedingungen der Zellen (37 °C und 5 % CO₂) aufrechterhalten werden.

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer ist ein Mechanismus des strahlungslosen Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren (einem Donor und einem Akzeptor), der zum ersten Mal von einem deutschen Physiker Theodor Förster im Jahr 1946 beschrieben wurde (Sun *et al.* 2011).

Absorbiert ein Fluorophor Licht einer bestimmten Wellenlänge, versetzt sich dieser aus dem elektronischen Grundzustand (S_0) in einen elektronisch angeregten Zustand (S_1 , vgl. Abb. 3-2). In diesem energetisch höheren Zustand beginnt das Molekül zu schwingen, wodurch es einen Teil seiner Energie zunächst strahlungslos an die Umgebung abgibt. Dabei durchläuft das Molekül mehrere Schwingungszustände, bis es im Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands ankommt. Dieser Prozess wird auch als vibronische Relaxation bezeichnet. Danach kehrt das Molekül in seinen elektronischen Grundzustand zurück und emittiert dabei Licht (Atkins und de Paula 2006). Dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die mittlere Zeit, in der ein Molekül im elektronisch angeregten Zustand verbleibt, wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet. Diese beträgt meistens einige Nanosekunden (Lakowicz 2006). Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist größer als die des absorbierten (Stokes 1852), weil ein Teil der Anregungsenergie durch die Vibration des Moleküls freigesetzt wurde.

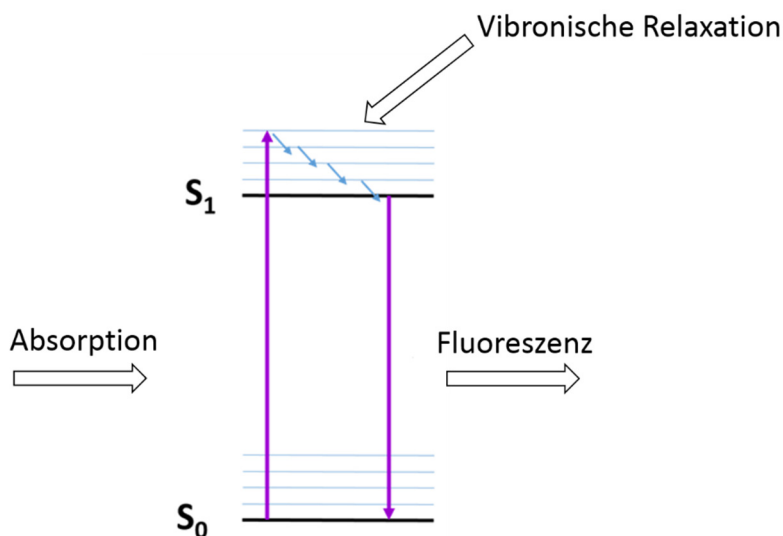


Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Fluoreszenz-Entstehung. S_0 entspricht dem elektronischen Grundzustand eines Moleküls und S_1 dem elektronisch angeregten Zustand. Die violetten Pfeile stellen die Elektronen-Übergänge und die blauen die vibronischen Übergänge dar.

Beim Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer wird ein Donor-Fluorophor mit Licht angeregt und dadurch in einen energetisch höheren Zustand versetzt (vgl. Abb. 3-3). Die Anregungs-Energie wird auf einen Akzeptor-Fluorophor strahlungsfrei, über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, übertragen, wodurch sich der Akzeptor in einen höheren Energiezustand versetzt. Folglich emittiert der Akzeptor-Fluorophor Licht.

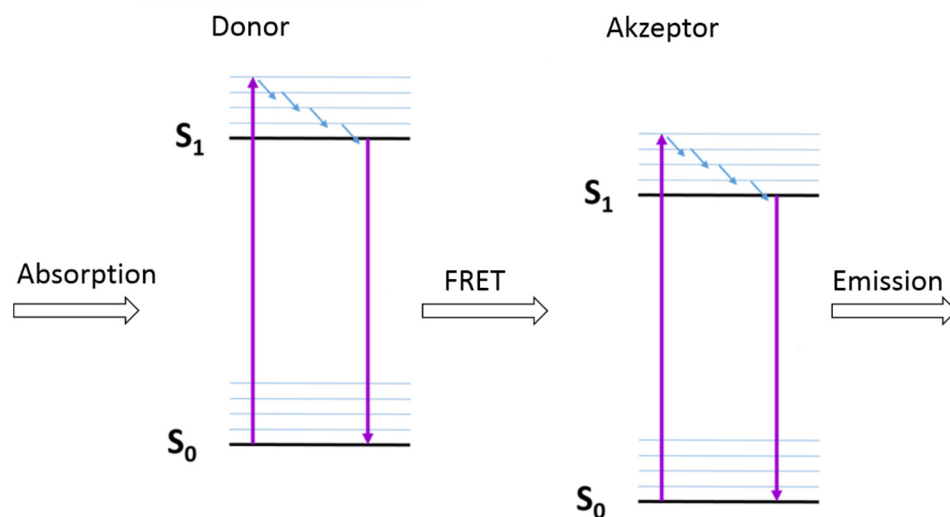
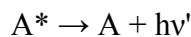
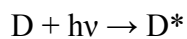


Abb. 3-3 Darstellung des FRETs.

Der FRET-Prozess kann vereinfacht folgendermaßen beschrieben werden:



D und A stehen für Donor und Akzeptor im energetischen Grundzustand und D* und A* Donor und Akzeptor im energetisch höherem Zustand. $h\nu$ entspricht der absorbierten und $h\nu'$ emittierten Energie.

Der Energietransfer und die Effizienz der Energieübertragung (FRET-Effizienz) zwischen den beiden Fluorophoren ist vom Abstand zwischen den beiden Fluorophoren, von ihrer räumlichen Orientierung und vom spektralen Überlappungsintegral des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors abhängig (Sun *et al.* 2011). Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, damit FRET stattfinden kann. Dabei ist es wichtig zu betonen, dass die auf den Akzeptor übertragene Energie nicht aus der Donor-Emission resultiert (Lakowicz 2006). Der Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor erfolgt über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Deswegen wird manchmal der Begriff *RET* (Resonanz-Energietransfer) statt *FRET* verwendet (Lakowicz 2006). Die Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor wird durch die Gl.1 beschrieben:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Gl. 1}$$

In der Gl. 1 ist E die FRET-Effizienz, r der intermolekulare Abstand und R_0 der Förster-Radius. Der Förster-Radius ist der intermolekulare Abstand, bei dem 50% der Donor-Energie auf den Akzeptor übertragen wird, und damit spezifisch für jedes FRET-Paar. Die Förster-Radien liegen im Bereich von 3 bis 6 nm. Die Formel veranschaulicht, dass die FRET-Effizienz mit abnehmendem Abstand der Moleküle voneinander abnimmt. Nach Theodor Förster liegt die intermolekulare Distanz (r), bei der der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen zwei Molekülen erfolgen kann, im Bereich von ~ 1-10 nm (Sekar und Periasamy 2003, Sun *et al.* 2011).

Für die Untersuchung der Interaktionen zwischen zwei Proteinen wurde in dieser Arbeit das Donor / Akzeptor-Paar *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) und *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) verwendet, dessen Überlappungsintegral für einen effizienten Energietransfer ausreichend ist (vgl. Abb. 3-4). Der Förster-Radius für das CFP / YFP-Paar beträgt 4,9 nm (Patterson *et al.* 2000).

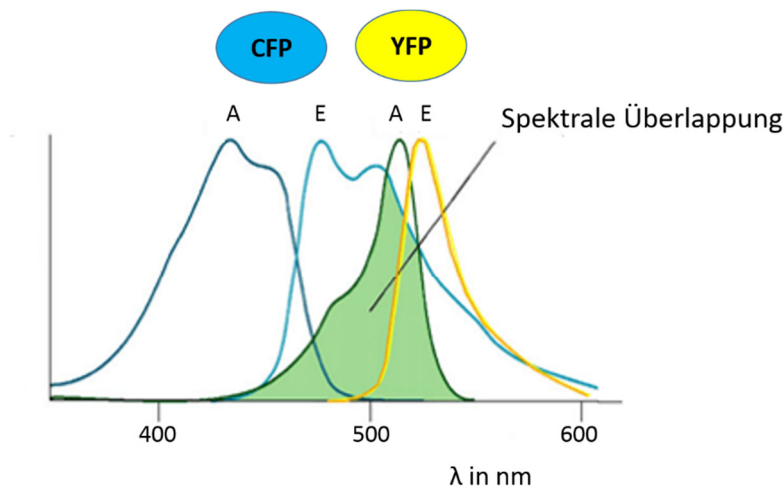


Abb. 3-4 Absorptions- (A) und Emissions- (E) Spektren von CFP und YFP (modifiziert nach *microscopy.berkeley.edu*).

CFP wurde mit der Wellenlänge von 444 nm angeregt und übertrug einen Teil seiner Anregungsenergie auf YFP (vgl. Abb. 3-5). Durch den Energietransfer wurde YFP in ein höheres Energieniveau überführt.

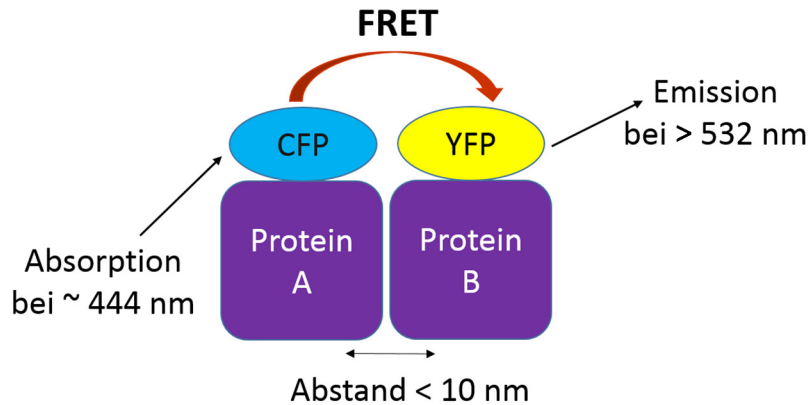


Abb. 3-5 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen zwei Proteinen, die mit CFP bzw. YFP gekoppelt sind. Befinden sich zwei Proteine nah einander, erfolgt nach der Anregung von CFP eine strahlungslose Energieübertragung über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen CFP und YFP. Nach der Energieübertragung emittiert das YFP Licht.

Die darauffolgende Rückkehr des Akzeptormoleküls in seinen energetischen Grundzustand führte zur Emission des Lichts (> 532 nm).

Der Abstand zwischen den zu untersuchenden Proteinen war der ausschlaggebende Faktor für die Effizienz des Energietransfers (vgl. Gl. 1).

3.2.4.2. *Sensitized Emission-FRET*

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen die FRET-Methode „*Sensitized Emission*“ angewandt. Diese FRET-Methode ermöglicht eine Bestimmung des FRETs in lebenden Zellen, ohne dabei die Fluorophore, die an die zwei zu untersuchenden Proteine gekoppelt sind, durch das Ausbleichen (*Photobleaching*) zu zerstören. Mit Hilfe der *Sensitized Emission* wird die Fluoreszenz des Akzeptors (hier: YFP) nach der Anregung des Donors (hier: CFP) induziert, wobei ein FRET-Bild I_{DA} aufgenommen wird (Zal und Gascoigne 2004). I_{DA} ist die Akzeptor-Emission nach der Anregung des Donors. Für die Bestimmung der FRET-Effizienz ($FRET_{eff}$) wurde die infolge des stattgefundenen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers entstandene Emission des Akzeptors in Korrelation zur Gesamtemission beider Fluorophore gesetzt. Die Korrelation kann mit folgender Gleichung (vgl. Gl. 2) beschrieben werden:

$$FRET_{eff} = \frac{F_{corr}}{F_{corr} + G * I_{DD}} \quad \text{Gl. 2}$$

F_{corr} entspricht der „*Sensitized Emission*“ (vgl. Gl. 3), die folgendermaßen definiert wird:

$$F_{corr} = I_{DA} - a * (I_{AA} - c * I_{DD}) - d * (I_{DD} - b * I_{AA}) \quad \text{Gl. 3}$$

In der Gl. 3 ist I_{DA} die Akzeptor-Emission nach der Anregung des Donors, I_{AA} ist die Akzeptor-Emission nach der Anregung des Akzeptors und I_{DD} entspricht der Donor-Emission nach der Anregung des Donors. Die Parameter a, b, c und d sind so genannte *Bleedthrough*- oder *Crosstalk*-Koeffizienten (Zal und Gascoigne 2004). Da die Absorptionsspektren von CFP und YFP nah beieinander liegen (vgl. Abb. 3-4), wird auch YFP durch die Anregungswellenlänge von CFP (hier 444 nm) angeregt. Zusätzlich wird ein Teil der CFP-Fluoreszenz im YFP-Emissionsfilter (565/40 nm) detektiert. Diese Anteile des von CFP und YFP emittierten Lichts müssen bei der Berechnung der FRET-Effizienz berücksichtigt und korrigiert werden. Dafür wurden zwei Zell-Proben gemessen, von denen eine nur CFP und die andere nur YFP enthielt. Jede Zell-Probe wurde durch die CFP- und YFP-Anregungswellenlänge angeregt. Die einzelnen Emissionen wurden bestimmt und die *Crosstalk*-Koeffizienten daraus folgendermaßen berechnet (vgl. Gl. 4):

$$a = \frac{I_{DA}}{I_{AA}}; b = \frac{I_{DD}}{I_{AA}}; c = \frac{I_{AA}}{I_{DD}}; d = \frac{I_{DA}}{I_{DD}} \quad \text{Gl. 4}$$

Da die *Sensitized Emission* abhängig vom optischen System der jeweiligen FRET-Apparatur ist, wurde der konstante Factor G (Zal und Gascoigne 2004) von Bernardini *et al.* für die hier verwendete FRET-Apparatur bestimmt (Bernardini *et al.* 2010). Der Faktor G (vgl. Gl. 5) wird als das Verhältnis der *Sensitized Emission* zu der Differenz der Donor-Emission nach dem Ausbleichen des Akzeptors und der Donor-Emission vor dem Ausbleichen des Akzeptors definiert (Zal und Gascoigne 2004):

$$G = \frac{F_{corr}}{(I_{DD}^{post} - I_{DD})} \quad \text{Gl. 5}$$

Die Software *ANUFIS* (*Automated and Uncomplicated FRET Imaging Solution*) für die Durchführung und Auswertung der FRET-Experimente wurde von Dr. rer. medic. A. Bernardini und C. Wotzlaw entwickelt (Bernardini *et al.* 2010).

3.2.4.3. Auswertung einer FRET-Messung

In den Experimenten sollte die Effizienz der Energieübertragung (FRET-Effizienz) zwischen zwei Proteinen bestimmt werden. Dabei wurde das eine Protein mit dem Fluorophor CFP (ECFP, *Clontech GmbH*) und das andere mit YFP (EYFP, *Clontech GmbH*) markiert. Hierfür wurden von Dr. rer. nat. Rebecca Konietzny Plasmid-Konstrukte erstellt, die außer der für das zu untersuchende Protein kodierenden Sequenz eine ECFP- oder EYFP-Sequenz aufwiesen. Zwei Beispiele der Plasmid-Konstrukte sind in der Abb. 3-6 dargestellt.

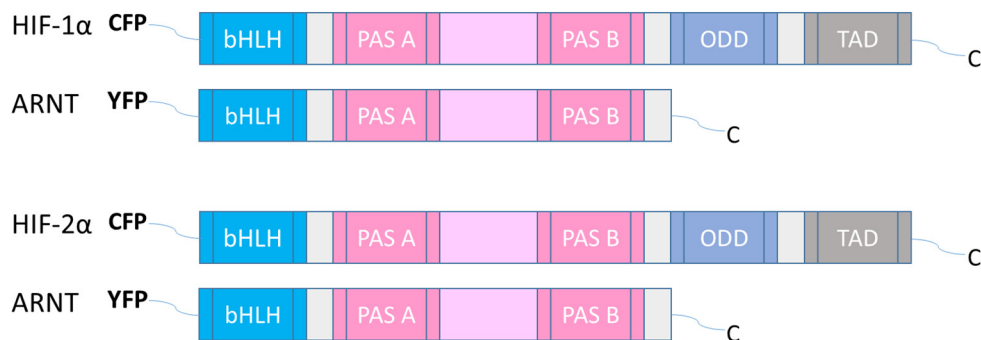


Abb. 3-6 Schematische Darstellung der Transkriptionskomplexe HIF-1α / ARNT und HIF-2α / ARNT, die mit den Fluorophoren CFP bzw. YFP fusioniert sind. Die Fluorophore sind am N-Terminus der zu untersuchenden Proteine gekoppelt.

Die Plasmid-Konstrukte wurden in humane Osteosarkomzellen U2OS mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *Viafect* (*Promega*) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei betrug das Transfektions-Verhältnis Donor (CFP-gekoppeltes Plasmid) zu Akzeptor (YFP-gekoppeltes Plasmid) 1 zu 3. Es sollten im Idealfall für alle Donor-Moleküle ausreichend Akzeptor-Moleküle vorhanden sein. Nach 24 h wurden in den Zellen CFP- bzw. YFP-getaggte Proteine exprimiert und die FRET-Messungen durchgeführt. Bei jeder Messung wurde die FRET-Effizienz je Zelle in ca. 35-80 Zellen bestimmt.

Die bei einer FRET-Messung entstandenen Messwerte wurden nach der Gleichung der nichtlinearen Regression *One site- Specific Binding* (vgl. Gl. 6) ausgewertet. Dabei ist die FRET-Effizienz E eine Funktion der Akzeptor-Konzentration (-Fluoreszenzintensität), $[YFP]$. E_{\max} ist der maximale Wert für die FRET-Effizienz, der den Plateau-Bereich der Kurve ausmacht. Der Parameter K entspricht der Dissoziationskonstante.

$$E = \frac{E_{\max} * [YFP]}{[YFP] + K} \quad \text{Gl. 6}$$

Ist $[YFP] \ll K$, ist die FRET-Effizienz proportional zur Konzentration/ Fluoreszenzintensität des Akzeptors. Das bedeutet, die Bindung zwischen zwei Molekülen ist nicht spezifisch und kann nur aufgrund derer hohen Expression und zufälligen Verteilung in der Zelle erfolgen (vgl. Abb. 3-7 A, C).

Bei $[YFP] \gg K$ geht es um eine spezifische Bindung zwischen zwei Molekülen. In diesem Fall hängt die FRET-Effizienz nicht von der Konzentration des Akzeptors in der Zelle ab, weil jedes Donormolekül mit einem Akzeptormolekül gesättigt wird (vgl. Abb. 3-7 B, D).

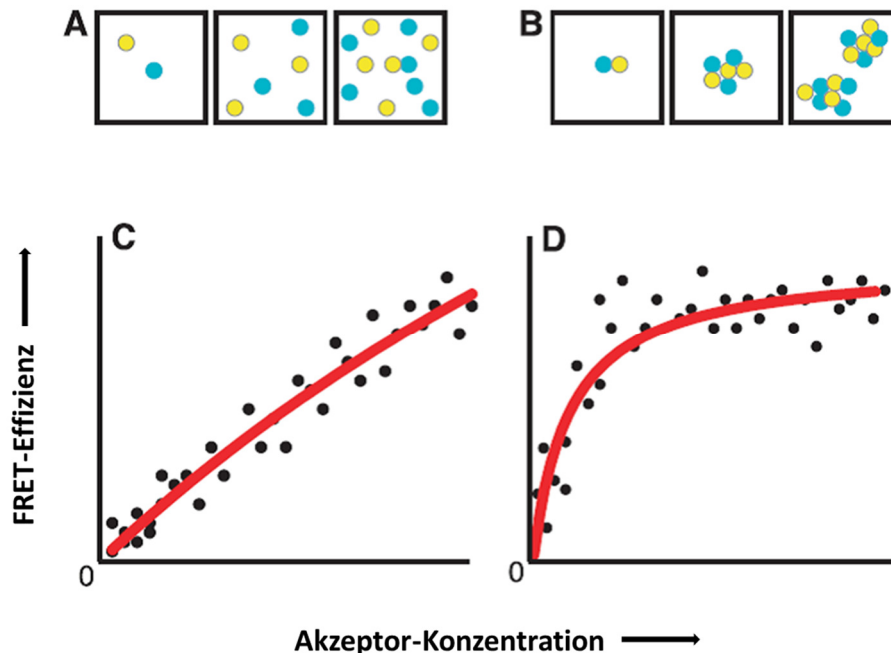


Abb. 3-7 Darstellung einer nicht spezifischen (A, C) und spezifischen Bindung zwischen zwei Molekülen (B and D). Blaue Kreise repräsentieren CFP-Moleküle und gelbe YFP-Moleküle. Bei einer nicht spezifischen Bindung ist die FRET-Effizienz direkt zur Akzeptor-Konzentration proportional (C), während bei einer spezifischen Bindung eine Sättigung erfolgt (D) (Zacharias *et al.* 2002).

3.2.4.4. Aufbau der Apparatur für FRET-Messungen

Für die Durchführung von FRET-Messungen wurde ein inverses Mikroskop (*Eclipse Ti, Nikon*) mit *Perfect Focus System* (PFS) verwendet. An das Mikroskop wurde ein Nipkow-Scheibensystem (*QLC100, Visitech International Ltd.*) angeschlossen, das über eine Glasfaser mit zwei Dioden-gepumpten Festkörperlaser 444 nm und 532 nm (*Crystalaser*) gekoppelt wurde. Das Laserlicht gelangt zunächst in einen *Multispec Microimager DualView* Strahlteiler, danach in die Lochblenden der Nipkow-Scheibe und folglich in den Strahlengang des Mikroskops. Anschließend wird das Licht über ein 60x Wasser-Objektiv auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Das von der Probe emittierte Licht passiert wieder den Strahlengang des Mikroskops, die Lochblenden der Nipkow-Scheibe und danach den *Multispec Microimager DualView* Strahlteiler (*Optical Insights*). Der Strahlteiler ermöglicht eine simultane Detektion der beiden emittierten Wellenlängen, der von CFP und der von YFP. Dadurch wird das Photobleaching der beiden Fluorophore reduziert. Mit Hilfe einer CCD-Kamera (*Orca ERG, Hamamatsu*) wird das emittierte Licht registriert.

4. Ergebnisse und Auswertung

Ziel dieser Arbeit war, die Interaktionen zwischen den Untereinheiten von Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren durch Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) in lebenden Osteosarcom-Zellen U2OS zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation analysiert. Für die FRET-Methode wurden Fusionsplasmide verwendet, die für die fluoreszenzmarkierten HIF-Untereinheiten codieren.

4.1. Untersuchung der Interaktionen von HIF-Untereinheiten mittels FRET

Für die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen den zu untersuchenden HIF-Untereinheiten gemessen. Für eine FRET-Messung wurden zwei Proteine in humanen Osteosarcom-Zellen U2OS exprimiert. Dabei war die eine HIF-Untereinheit mit dem *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) und die andere mit dem *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) N-terminal gekoppelt. Das YFP-markierte Plasmid wurde in dreifacher Menge in die Zellen eingebracht. Die FRET-Messungen wurden unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂ und 5 % CO₂) durchgeführt, weil die transfizierten HIF- α -Untereinheiten auch unter normoxischen Bedingungen in den Zellen exprimiert werden und für 48-72 h in den Zellen vorhanden sind.

Die Effizienz des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET-Effizienz) wurde in Abhängigkeit vom Akzeptor / Donor-Verhältnis und von der Akzeptor-Konzentration in der jeweiligen Zelle ermittelt. Dabei ist die FRET-Effizienz ein prozentualer Anteil der vom Donor (CFP) auf den Akzeptor (YFP) übertragenen Energie, bezogen auf die vom Donor absorbierte Energie. Die nach der Durchführung der FRET-Messung erhaltenen FRET-Effizienz-Werte wurden mit Hilfe der nichtlinearen Regression *One site- Specific Binding*, mit der Statistiksoftware *GraphPad Prism 7*, analysiert. Für die Auswertung der Ergebnisse war der Verlauf der erhaltenen Kurve entscheidend. Wenn zwei Proteine miteinander interagieren, weist die FRET-Kurve eine Sättigung auf. Die FRET-Effizienz vergrößert sich mit steigender Akzeptor-Konzentration, bis die Kurve ihr Plateau erreicht. Im Plateau-Bereich hat die FRET-Effizienz ihren maximalen Wert und bleibt auch bei steigender Akzeptor-Konzentration

konstant. Der maximale FRET-Effizienz-Wert soll bei einer spezifischen Interaktion erfahrungsgemäß > 9 % sein. Dabei kann der Wert für die maximale FRET-Effizienz bei einem Proteinpaar bei mehreren Messungen variieren.

4.1.1. Der Einfluss von Mutationen auf die HIF-2 α / ARNT- Interaktion

In dieser Arbeit wurden alle verwendeten Plasmide von der Firma *Seqlab* (Göttingen) sequenziert. Durch die Sequenzierung wurden Veränderungen in der Nukleotidsequenz der Plasmide festgestellt, die für das humane EPAS1 (*endothelial PAS domain-containing protein 1*), auch als HIF-2 α bezeichnet, codieren. Im HIF-2 α -Insert wurde die Nukleobase Adenin an der Position 413 statt Guanin identifiziert. Der Basenaustausch führt zur Punktmutation in der Proteinsequenz, wobei die Aminosäure Tyrosin statt Cystein an der Position 138 (Cys138Tyr) in der PAS-A-Region des HIF-2 α -Proteins entsteht.

Außer der o. g. Punktmutation fehlte bei den Fusionsplasmiden pExp-CFP-HIF-2 α und pExp-YFP-HIF-2 α ein Triplet ACC (ein Adenin an der Position 2608 und zwei Cytosine an den Positionen 2609 und 2610) sowie der Stopcodon TGA. Das Triplet ACC codiert für die Aminosäure Threonin an der Position 870 in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne, die die letzte Aminosäure in der Aminosäuresequenz von HIF-2 α ist.

Die o. g. Veränderungen in den Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Methode der ortsspezifischen Mutagenese (vgl. Abschn. 3.2.2.9) korrigiert. Da einzelne Punktmutationen, besonders in der PAS-Region, zu gravierenden Änderungen der Interaktion von HIF-2 α und ARNT führen können (Erbel *et al.* 2003), wurden zum Vergleich auch die nicht korrigierten HIF-2 α -Plasmide für FRET-Messungen verwendet.

Als Negativkontrolle wurde die FRET-Effizienz zwischen löslichem ECFP (hier: CFP) und EYFP (hier: YFP) gemessen. Die während der FRET-Messung aufgenommenen Bilder zeigten deutlich, dass die beiden Fluorophore in der Zelle homogen verteilt waren (vgl. Abb. 4-1). Die beiden Fluorophore werden meistens viel stärker als die Fusionsproteine in U2OS-Zellen exprimiert. Wenn ihre Konzentration in der Zelle hoch ist, wird ein unspezifisches FRET-Signal, auch als *Random FRET* bezeichnet, detektiert. Der Kurvenverlauf zeigt deutlich, dass die FRET-Effizienz direkt proportional zur YFP-Konzentration ist. Da bei der FRET-Messung von CFP und YFP die FRET-Effizienz mit steigender YFP-Konzentration zunahm, wurden die Messwerte mit linearer Regression gefittet.

CFP und YFP

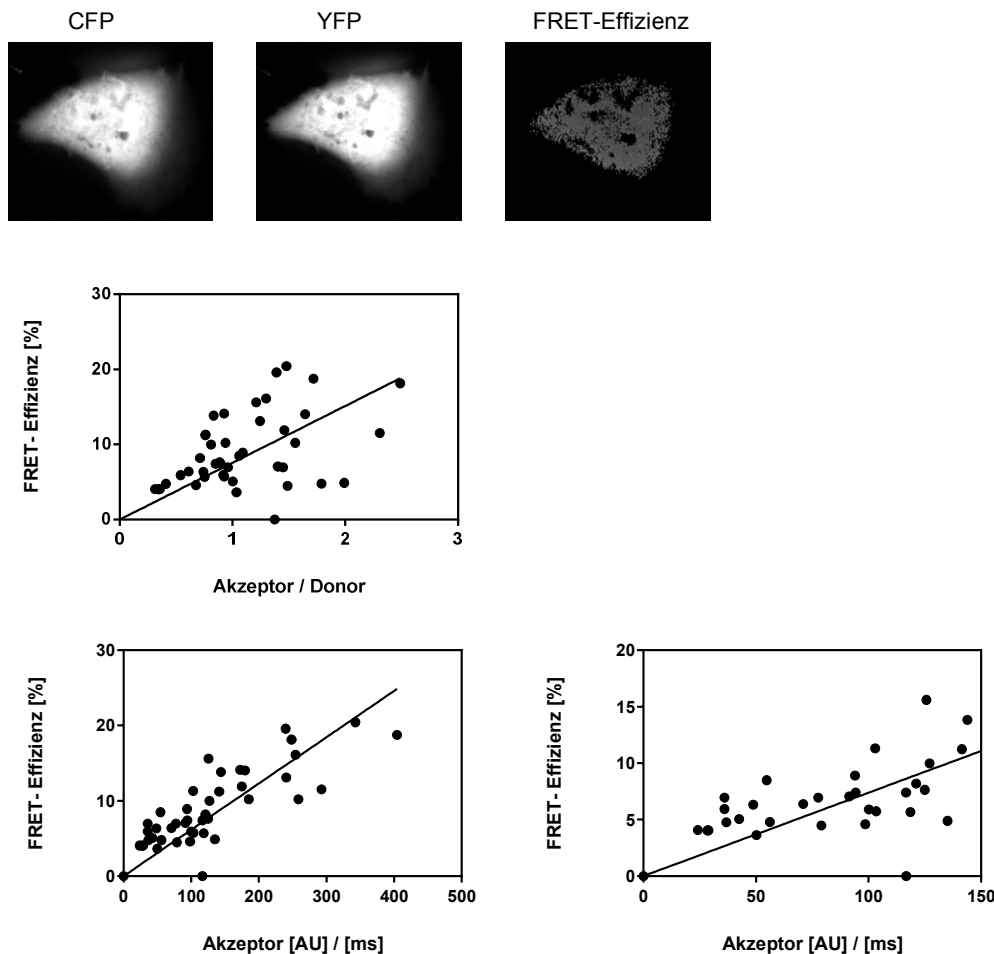
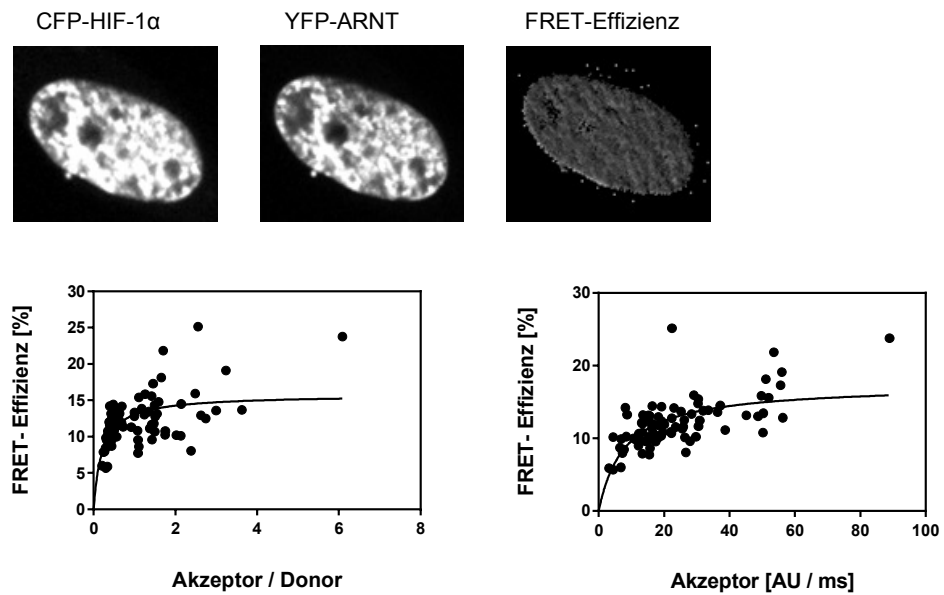


Abb. 4-1 Unspezifischer Energietransfer zwischen CFP und YFP. Oben ist die FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Akzeptor / Donor-Verhältnis dargestellt. Unten links ist die FRET-Effizienz in Abhängigkeit von der Akzeptor-Konzentration (Arbitrary units (AU) pro ms) dargestellt. Unten rechts ist die FRET-Effizienz der Negativkontrolle im Konzentrationsbereich der Fusionsproteine gezeigt. Für eine FRET-Messung wurden 2×10^5 humane Osteosarkom-Zellen U2OS pro Glasboden-Petrischale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die jeweiligen Fusionsplasmide im Verhältnis Donor (CFP) zu Akzeptor (YFP) 1 zu 3 μg mit dem Transfektionsreagenz ViaFect™ (Promega) transfiziert. Nach 24 h wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen den beiden Proteinen in lebenden Zellen unter normoxischen Bedingungen (21 % O_2 und 5 % CO_2) gemessen. Jeder Messpunkt entspricht dem Energietransfer in einer einzelnen Zelle. Die Messpunkte ($N = 43$) wurden mit linearer Regression gefittet. Anzahl der Versuche $N = 4$.

Die Interaktion zwischen den Untereinheiten HIF-1 α und ARNT bzw. HIF-2 α und ARNT ist bekannt (Semenza *et al.* 1997). In dieser Arbeit wurden FRET-Messungen zum Nachweis dieser Interaktionen durchgeführt und dienten als Positivkontrollen (vgl. Abb. 4-2).

CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT

a)

CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT

b)

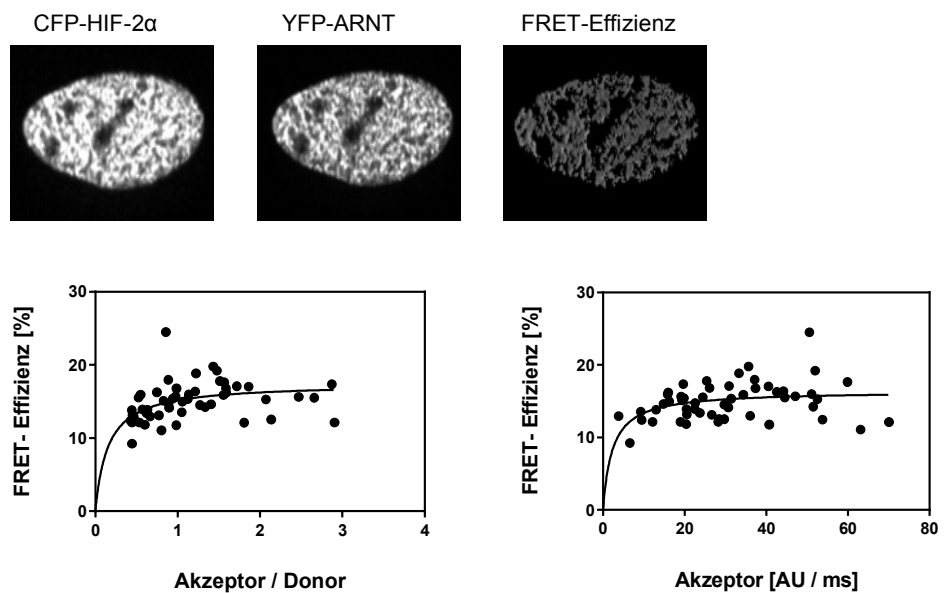


Abb. 4-2 Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α (a) bzw. CFP-HIF-2 α (b) mit YFP-ARNT. Links ist die FRET-Effizienz in Abhängigkeit von dem Akzeptor/ Donor-Verhältnis und rechts von der Konzentration des Akzeptors dargestellt. Die U2OS-Zellen wurden mit den Fusionsplasmiden CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT bzw. CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT transfiziert. Nach 24 h wurde der Energietransfer zwischen dem jeweiligen Proteinpaar in lebenden Zellen bei 37 °C und 21 % O₂ gemessen. Jeder Messpunkt entspricht dem Energietransfer in einer einzelnen Zelle. Die einzelnen Messpunkte (N = 84 bei a) und N = 53 bei b)) wurden mit nichtlinearer Regression gefittet. Die Anzahl der Versuche von CFP-HIF-1 α / ARNT war N = 5 und von CFP-HIF-2 α / ARNT N = 3.

Im Gegensatz zu CFP und YFP waren die Fusionsproteine CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT sowie CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT im Zellkern lokalisiert. Dies war anhand der ovalen Form, die typisch für einen Zellkern ist, sowie der heterogenen Verteilung der fluorophormarkierten HIF-Untereinheiten zu sehen. Die heterogene Verteilung ist auf die Chromatin-Struktur zurückzuführen. Chromatin besteht aus einem linearen DNA-Molekül und zahlreichen Proteinen, die perlenschnurartig auf der DNA aufgereiht sind (Voet *et al.* 2002).

Wie erwartet, konnte der Förster-Resonanz-Energietransfer zwischen CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT sowie CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT festgestellt werden (vgl. Abb. 4-2). Bei den beiden Proteinpaaren wies sowohl die Akzeptor / Donor-Kurve als auch die Akzeptor-Kurve eine Sättigung auf.

Für die FRET-Messungen wurde ARNT als Akzeptor verwendet, weil die Untereinheit stärker in den Zellen exprimiert wird. Voraussetzung für den Energietransfer ist die ausreichende Konzentration von Akzeptormolekülen, an welche die Energie der Donormoleküle im Falle einer spezifischen Interaktion übertragen werden kann.

Für die Dimerisierung von HIF- α und ARNT spielt die PAS-Domäne der beiden Untereinheiten eine wichtige Rolle (Semenza *et al.* 1997). Dies bestätigten FRET-Messungen mit dem CFP-HIF-2 α -Protein, bei dem die PAS-Domäne komplett deletiert war. Die FRET-Effizienz war im Vergleich zur Positivkontrolle mit dem CFP-HIF-2 α -Protein mit vollständiger Aminosäuresequenz stark reduziert und lag bei den meisten Zellen auch bei hohem Akzeptor / Donor-Verhältnis von 6 bis 8 sowie bei den Akzeptor-Konzentrationen von 20-30 AU/ms unter 5 % (vgl. Abb. 4-3). Dabei betrug die FRET-Effizienz bei der Positivkontrolle in den meisten Zellen 10% und höher (vgl. Abb. 4-2 b)).

Auf den FRET-Bildern war eine punktuelle Verteilung der Fusionsproteine CFP-HIF-2 α mit deletierter PAS-Domäne bzw. YFP-ARNT im Zellkern zu sehen. Die einzelnen leuchtenden Punkte waren gut definiert und auffällig größer als bei dem CFP-HIF-2 α mit vollständiger Aminosäuresequenz.

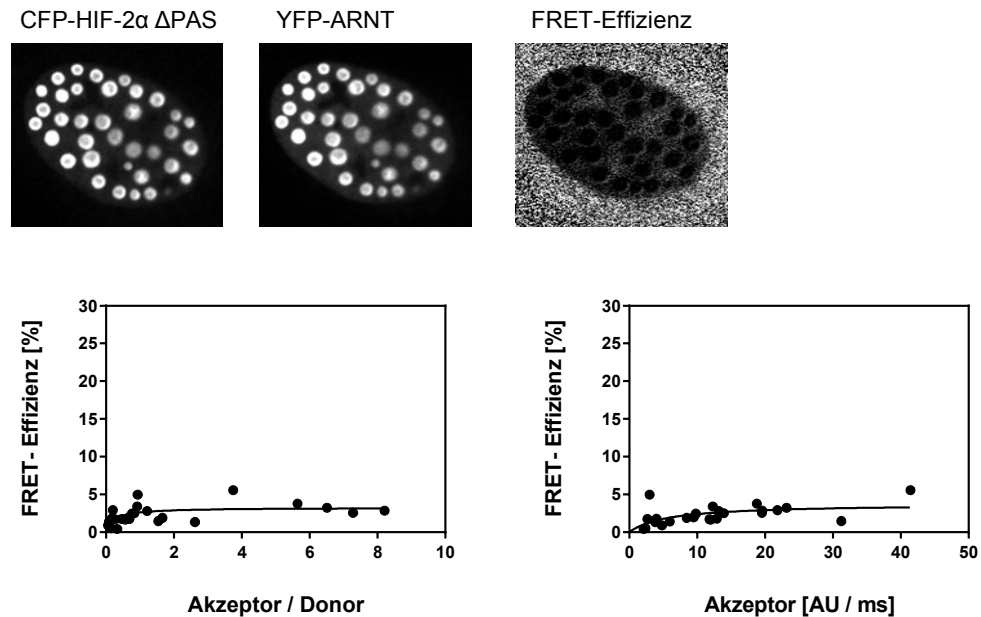
CFP-HIF-2 α Δ PAS und YFP-ARNT

Abb. 4-3 Interaktionsanalyse zwischen CFP-HIF-2 α mit deletierter PAS-Domäne und YFP-ARNT. Die einzelnen Messpunkte (N = 24) wurden mit nichtlinearer Regression gefittet. Anzahl der Versuche N = 3.

Untersucht wurde auch die Interaktion der CFP-HIF-2 α -Untereinheit, die drei Punktmutationen (Gln322Glu, Met338Glu und Tyr342Thr) in der PAS-B-Domäne enthielt, mit YFP-ARNT. Auf den FRET-Bildern waren ebenfalls einzelne leuchtende Punkte zu sehen, die im Zellkern verteilt waren. Die drei Punktmutationen in der HIF-2 α -PAS-B-Domäne behinderten die Interaktion mit ARNT. Die starke Expression des Akzeptors, des Fusionsproteins YFP-ARNT, führte in manchen Zellen zu den FRET-Effizienz-Werten über 10 %. In der Abb. 4-4 ist ersichtlich, dass die beiden Kurven sogar bei sehr hohen Akzeptor-Konzentrationen von 200-300 AU/ms und Akzeptor / Donor-Verhältnissen keine Sättigung erreichen. Im Gegenteil wurde eine fast lineare Abhängigkeit der FRET-Effizienz-Werte von der Akzeptor-Konzentration festgestellt.

Bei einer weniger starken Expression des Akzeptors in einer anderen FRET-Messung wurde ein sehr schwaches FRET-Signal, unter 5 %, detektiert (vgl. Abb. 4-4).

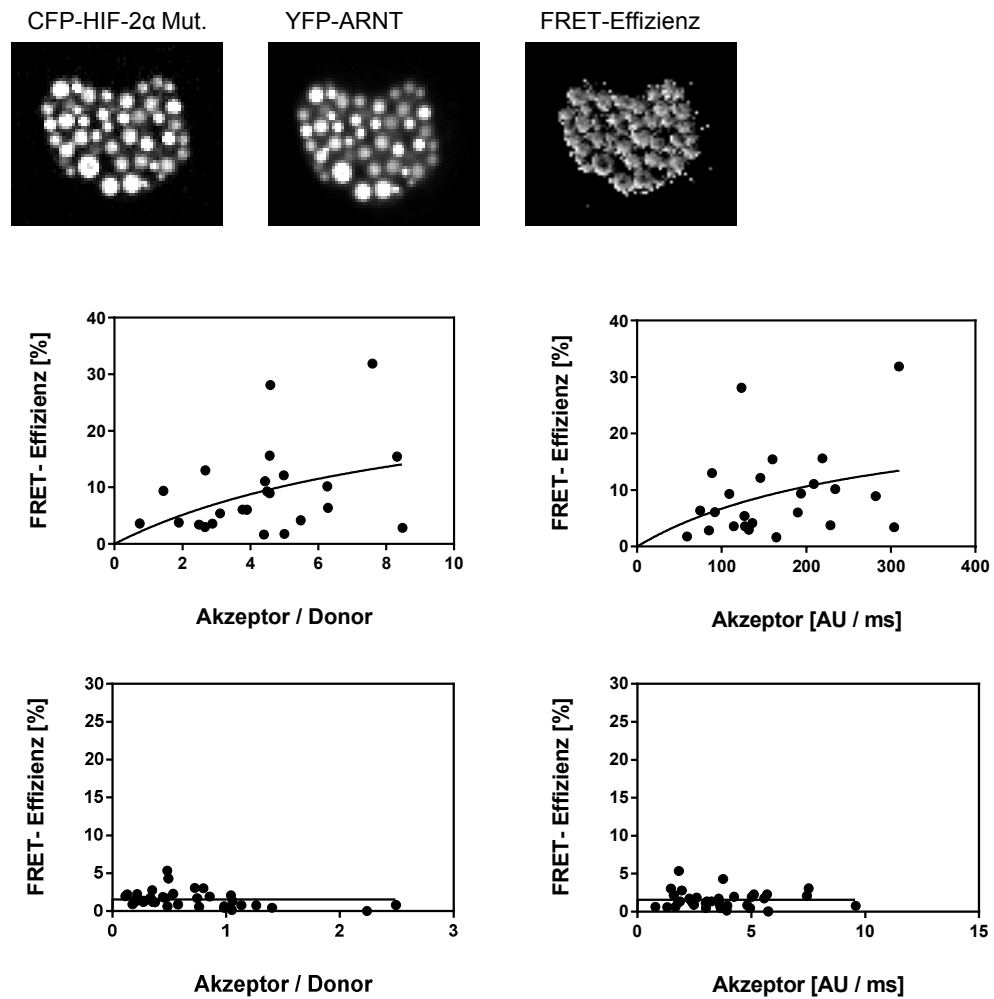
CFP-HIF-2 α Mutante und YFP-ARNT

Abb. 4-4 Interaktionsanalyse zwischen CFP-HIF-2 α mit drei Punktmutationen (hier: CFP-HIF-2 α Mutante) und YFP-ARNT. Die einzelnen Messpunkte (N = 24 oben und N = 37 unten) wurden mit nichtlinearer Regression gefittet. Anzahl der Versuche N = 3.

Die zufällig aufgetretene Punktmutation (Tyr138) in der PAS-A-Domäne von CFP-HIF-2 α sowie Deletion der Aminosäure Threonin an der Position 870 in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne und eines Stopcodons beeinflussten die Interaktion mit ARNT nicht (vgl. Abb. 4-5). Die beiden fluorophormarkierten HIF-Untereinheiten waren wie CFP-HIF-2 α mit korrekter Aminosäuresequenz und YFP-ARNT heterogen im Zellkern verteilt.

CFP-HIF-2 α Tyr138 Δ Thr870 und YFP-ARNT

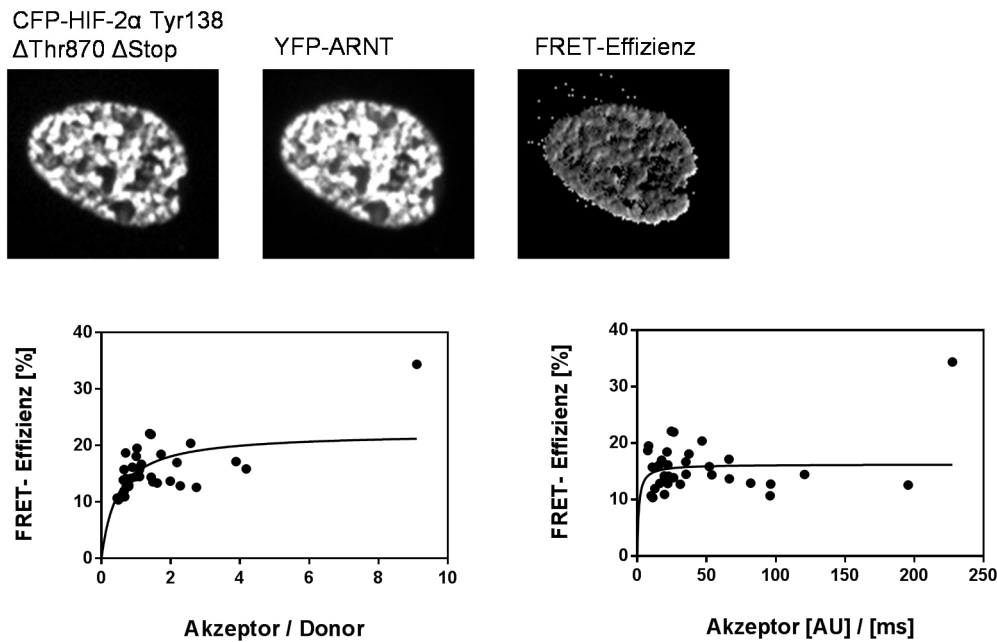


Abb. 4-5 Interaktion von CFP-HIF-2 α Tyr138 Δ Thr870 Δ Stopcodon mit YFP-ARNT. Die einzelnen Messpunkte (N = 38) wurden mit nichtlinearer Regression gefittet. Anzahl der Messungen N = 3.

Das FRET-Signal konnte detektiert werden und war spezifisch, denn die Akzeptor / Donor-Kurve erreichte bereits bei niedrigem Akzeptor / Donor-Verhältnis ihr Plateau.

Nach der Korrektur der Punktmutation in der PAS-Domäne wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen CFP-HIF-2 α Δ Thr870 Δ Stopcodon und YFP-ARNT gemessen (vgl. Abb. 4-6). Die FRET-Effizienz-Werte waren hoch und die Kurven wiesen eine Sättigung auf. Bei der Kurve, die die FRET-Effizienz in Abhängigkeit von der Akzeptor-Konzentration darstellt, lagen alle Messpunkte im Plateau-Bereich.

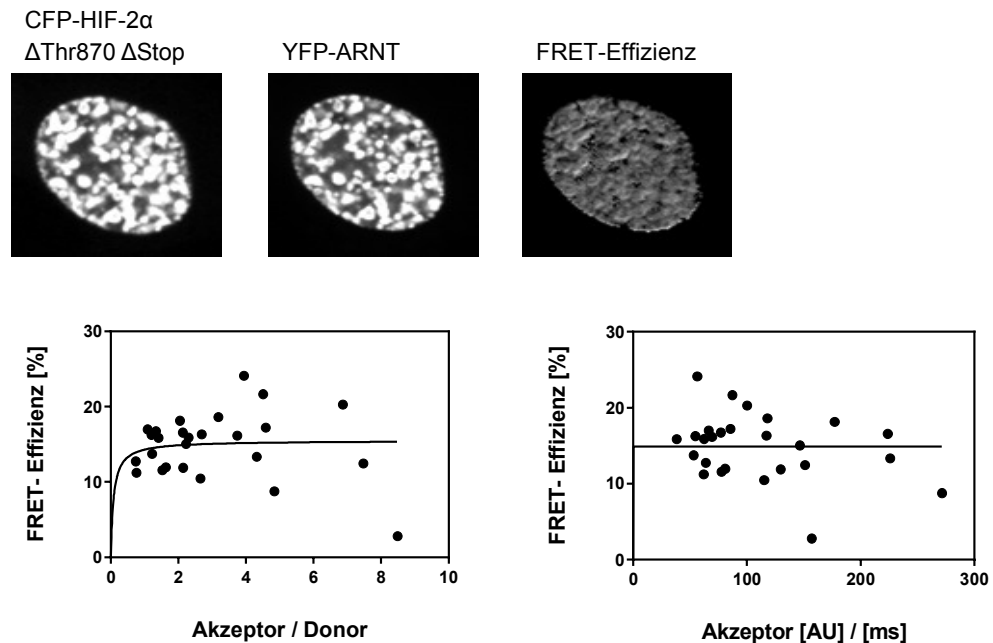
CFP-HIF-2 α Δ Thr870 Δ Stop und YFP-ARNT

Abb. 4-6 Interaktion von CFP-HIF-2 α Δ Thr870 Δ Stopcodon mit YFP-ARNT. Die einzelnen Messpunkte (N = 26) wurden mit nichtlinearer Regression gefittet. Anzahl der Messungen N = 4.

4.1.2. Interaktionsanalyse zwischen HIF-1 α und HIF-2 α sowie HIF-2 α und HIF-2 α

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Untereinheiten HIF-1 α und HIF-2 α bzw. HIF-2 α und HIF-2 α miteinander interagieren können. Dr. rer. nat. Jun Hu führte FRET-Messungen durch, die auf eine Interaktion zwischen den beiden Protein-Untereinheiten hinwiesen. Da in der Nukleotidsequenz der HIF-2 α -Untereinheit eine Punktmutation, Deletion sowie das Fehlen eines Stopcodons festgestellt wurden, wurden die Messungen in dieser Arbeit wiederholt.

Besonders interessant wäre eine Interaktion zwischen HIF-1 α und HIF-2 α . Beide Transkriptionsfaktoren weisen in Ihren bHLH- und PAS-Domänen hohe strukturelle Homologie auf (Tian *et al.* 1997). Aufgrund der Sequenzidentität der C-terminalen Transaktivierungsdomänen von den beiden HIF- α -Untereinheiten (HIF- α -UE) haben die beiden Proteine viele gemeinsame Zielgene. Dagegen tragen die Sequenzunterschiede in den N-terminalen Transaktivierungsdomänen dazu bei, dass die beiden HIF- α -UE auch HIF-1- bzw. HIF-2-spezifische Zielgene haben. Somit können die beiden HIF- α -UE unterschiedliche Effekte auf bestimmte physiologische Prozesse in der Zelle haben (Patel und Simon 2008).

In diesem Zusammenhang ist eine Interaktionsstudie von HIF-1 α und HIF-2 α von großer physiologischer Bedeutung.

Die in dieser Arbeit durchgeführten FRET-Messungen lieferten Ergebnisse, die für eine Interaktion der beiden α -Untereinheiten sprechen (vgl. Abb. 4-7). Die FRET-Effizienz in den meisten Zellen war höher als 10 % ab dem Akzeptor / Donor-Verhältnis von 5 und den Akzeptor-Konzentrationen von 20-30 AU / ms. Dagegen betrug der FRET-Effizienz-Wert bei dieser Akzeptor-Konzentration im Falle einer unspezifischen Interaktion wie bei CFP- und YFP-Leervektoren oder CFP-HIF-2 α mit deletierter PAS-Domäne und YFP-ARNT höchstens 5 %. Die FRET-Kurven, die eine Interaktion von HIF-1 α und HIF-2 α beschreiben, zeigen keine lineare Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der Akzeptor-Konzentration und dem Akzeptor / Donor-Verhältnis.

CFP-HIF-1 α und YFP-HIF-2 α

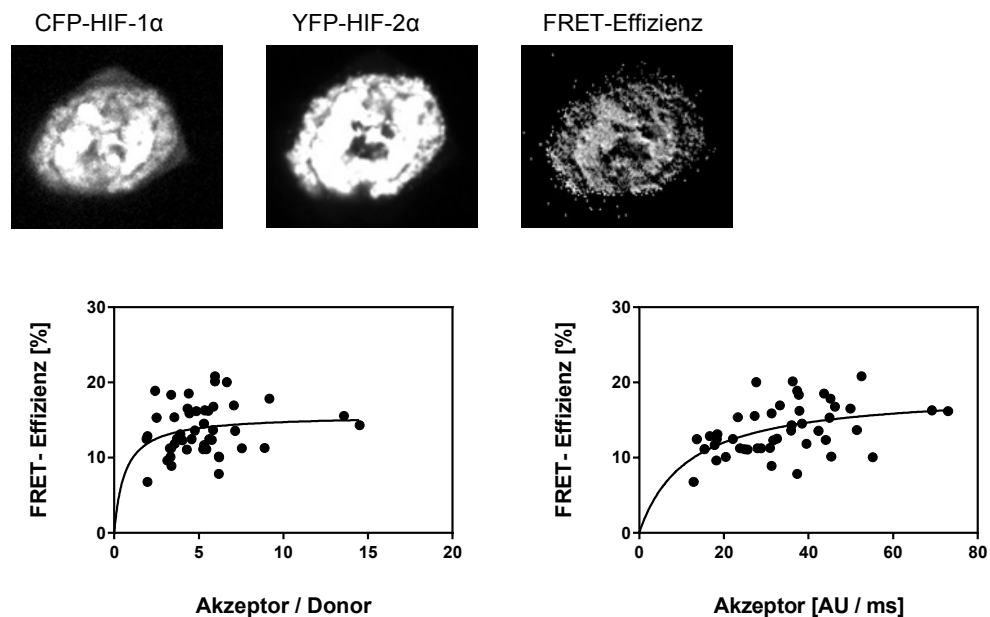


Abb. 4-7 Interaktion von CFP-HIF-1 α und YFP-HIF-2 α . Die Osteosarcom-Zellen U2OS wurden mit CFP-HIF-1 α und YFP-HIF-2 α transient transfiziert und nach 24 h erfolgte die Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers in lebenden Zellen bei 37 °C und 21 % O₂. Die Messpunkte (N = 46) wurden mit nichtlinearer Regression gefittet. Anzahl der Messungen N = 4.

Die Messungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers zwischen zwei HIF-2 α -Untereinheiten deuteten ebenfalls auf eine spezifische Interaktion hin (vgl. Abb. 4-8).

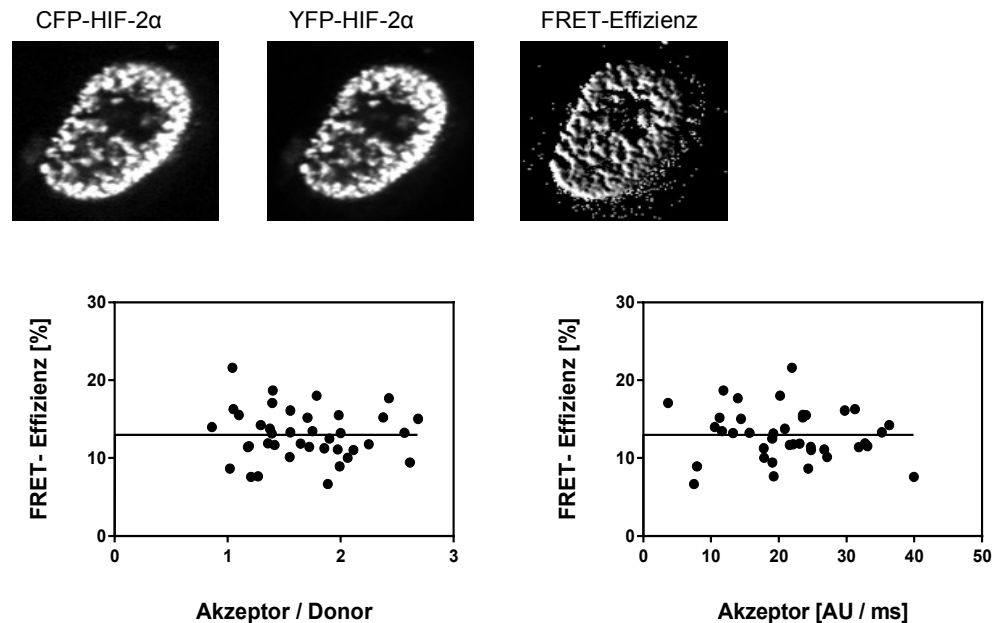
CFP-HIF-2 α und YFP-HIF-2 α 

Abb. 4-8 Interaktion von CFP-HIF-2 α und YFP-HIF-2 α . Es wurden 39 Zellen ausgewertet und die Messpunkte mit nichtlinearer Regression gefittet.

Trotz etwas breiterer Punkteverteilung, die bei Messungen in lebenden Zellen schwer zu vermeiden sind, im Vergleich zu den Positivkontrollen (vgl. Abb. 4-2) war keine Erhöhung der FRET-Effizienz bei steigender Akzeptor-Konzentration zu sehen. Die vorausgegangenen FRET-Messungen zur Untersuchung der HIF-2 α / HIF-2 α -Interaktion, bei denen HIF-2 α -Plasmide mit zufällig aufgetretenen Mutationen verwendet wurden (Daten nicht gezeigt), wiesen ebenfalls auf eine Interaktion zwischen den beiden HIF-2 α -Untereinheiten hin. Das in Abb. 4-8 dargestellte Ergebnis mit den korrigierten Plasmiden bestätigte die Ergebnisse der FRET-Messungen mit mutierten Plasmiden.

4.1.3. Einfluss des HIF-2-Antagonisten auf die Heterodimerisierung von HIF-2 α und ARNT

Scheuermann *et al.* identifizierten einen künstlichen Liganden ((*N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-amine)), der an den hydrophoben Kern der mutierten PAS-B-Domäne der HIF-2 α -Untereinheit binden und deren Dimerisierung mit ARNT inhibieren kann (Scheuermann *et al.* 2013). Außerdem wurde eine starke Reduktion der Bindung des endogenen HIF-2 α -Proteins an ARNT in Kernextrakten der hypoxischen Hep3B-Zellen nach Zugabe dieser Verbindung festgestellt.

In dieser Arbeit wurde für die Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers in lebenden Zellen sowie für die Co-Immunpräzipitations-Experimente die o. g. Verbindung, der sog. *HIF-2 α -Antagonist 2*, von der Firma *Sigma-Aldrich* bezogen.

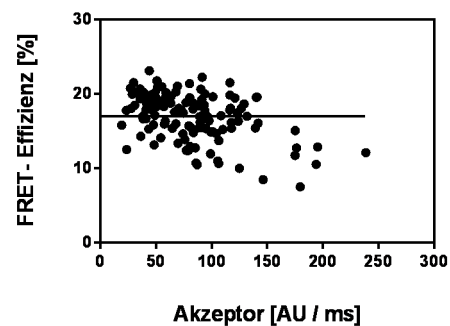
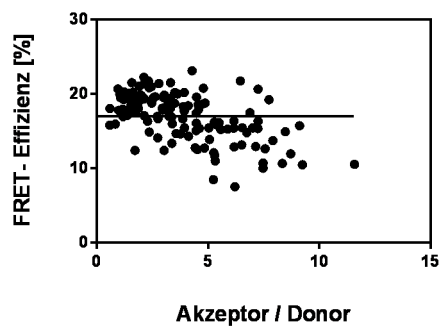
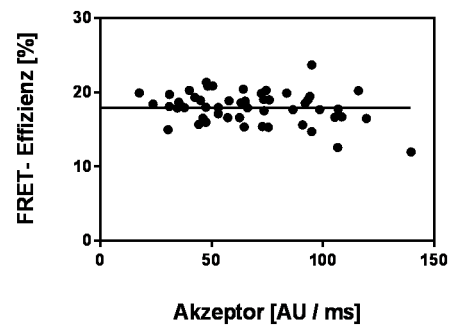
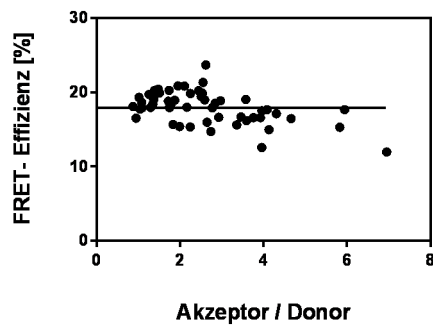
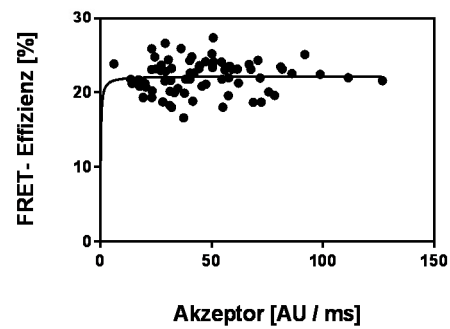
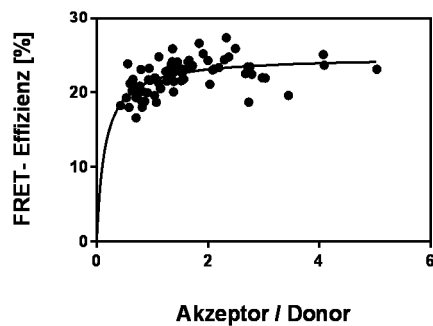
Zur Analyse der Wirkung des HIF-2 α -Antagonisten auf die Interaktion von HIF-2 α und ARNT wurde eine Konzentration des Antagonisten von 10 μ M gewählt. Diese Konzentration war nicht toxisch für transfizierte U2OS-Zellen im Gegensatz zu höheren Konzentrationen, bei denen einige Zellen schon nach 6 h Einwirkzeit „geschrumpft“ aussahen oder sich komplett vom Boden der Petrischale lösten. Bei der Konzentration von 10 μ M sollte die Interaktion zwischen HIF-2 α -PAS-B und ARNT-PAS-B stark inhibiert werden, wie die Ergebnisse des AlphaScreen-Assays und der Co-Immunpräzipitation von Scheuermann *et al.* zeigten. Zusätzlich wurde eine Reduktion der mRNA-Expression des HIF-2-Zielgens *VEGF* in 786-O-Zellen festgestellt (Scheuermann *et al.* 2013).

In der Abb. 4-9 sind Ergebnisse von drei FRET-Messungen nach der Inkubation der transfizierten U2OS-Zellen mit dem HIF-2 α -Antagonisten und eine Messung zum Vergleich nach der Inkubation mit 1%iger DMSO-Lösung dargestellt. Die Einwirkzeit des HIF-2 α -Antagonisten auf die transfizierten U2OS-Zellen betrug 18 h. Diese Inkubationszeit wurde von Scheuermann *et al.* gewählt, als sie die Expression des HIF-2-Zielgens *VEGF* in 786-O-Zellen (humane Nieren-Tumorzellen, bei denen das endogene HIF-2 α -Protein konstitutiv exprimiert und nicht abgebaut wird) nach der Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten untersuchten und eine Reduktion der Expression feststellten (Scheuermann *et al.* 2013).

Die Verteilung der Fluorophore in der Zelle änderte sich nach der Inkubation mit dem HIF-2 α -Antagonisten im Vergleich zur Kontrollprobe (CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT) nicht. Die CFP- und YFP-gekoppelten Fusionskonstrukte waren hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und heterogen verteilt (vgl. Abb. 4-9).

Die durchgeführten FRET-Messungen zeigten keine Senkung des FRET-Signals und keine bedeutende Änderung des Kurven-Verlaufs im Vergleich zur DMSO-Probe. Bei den zwei unteren Messungen erreichten die FRET-Kurven schon bei niedrigen Akzeptor-Konzentrationen und Akzeptor / Donor-Verhältnissen ihr Plateau.

a)



b)

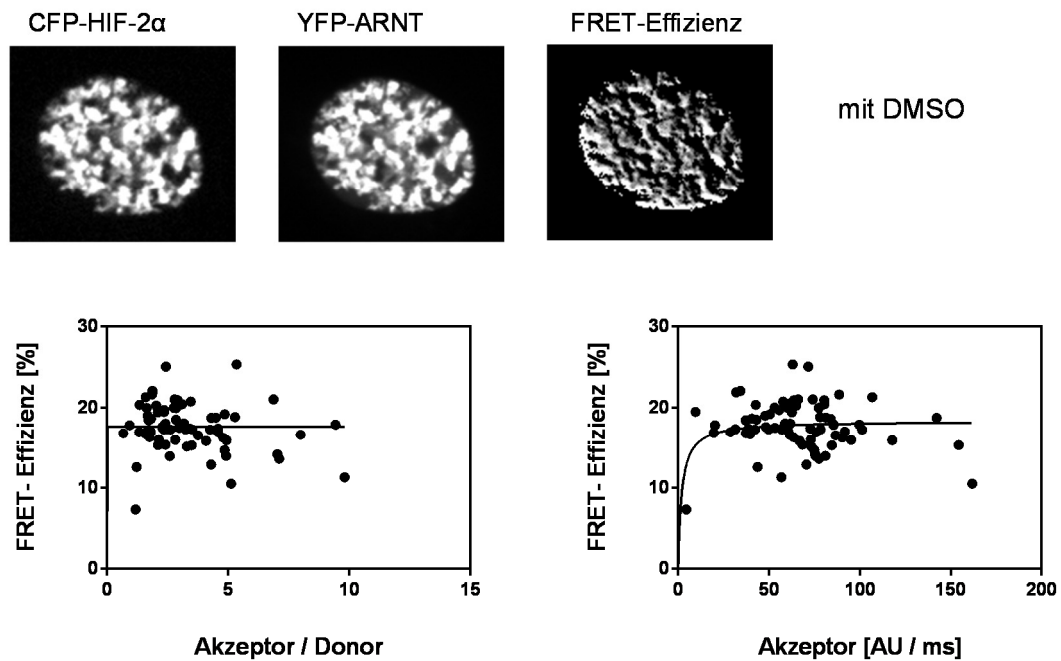


Abb. 4-9 Interaktionsanalyse von HIF-2α und ARNT nach Zugabe des HIF-2α-Antagonisten. Dargestellt sind Ergebnisse der drei FRET-Messungen nach der Inkubation mit dem HIF-2α-Antagonisten und eine repräsentative Kontroll-FRET-Messung mit DMSO. Die Osteosarcom-Zellen U2OS wurden mit den Fusionskonstrukten CFP-HIF-2α und YFP-ARNT transfiziert, für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, danach mit 10 μM HIF-2α-Antagonisten bzw. 1%iger DMSO-Lösung versetzt und für 18 h wieder im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der FRET bei 37 °C und 21 % O₂ in lebenden Zellen gemessen. Bei den FRET-Messungen mit dem HIF-2α-Antagonisten wurden 75, 52 bzw. 129 Zellen und bei der FRET-Messung mit DMSO 76 Zellen ausgewertet. Die Messpunkte wurden mit nichtlinearer Regression gefittet.

Um die Wirkung des HIF-2 α -Antagonisten auf die Zellen im zeitlichen Verlauf zu überprüfen, wurde eine Zeitreihen-Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers durchgeführt (vgl. Abb. 4-10).

CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT

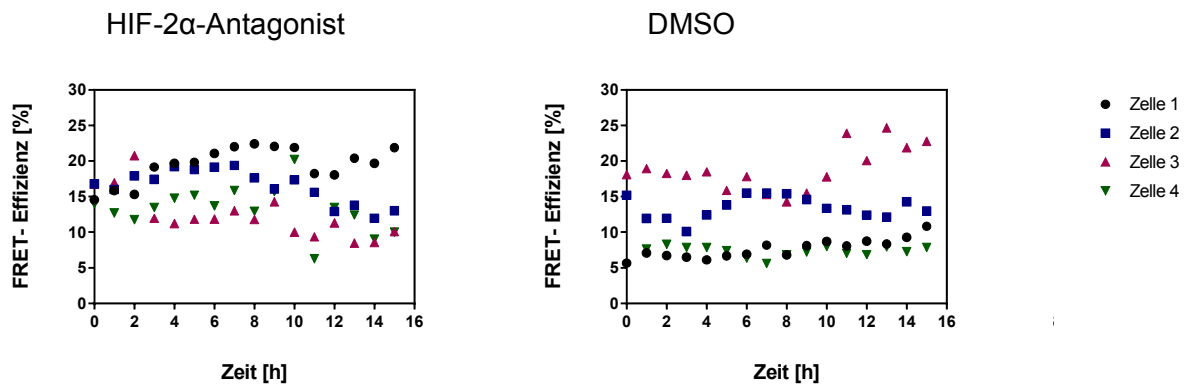


Abb. 4-10 Zeitreihen-Messungen des FRETs nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten bzw. 1%iger DMSO-Lösung. U2OS-Zellen wurden mit CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT transfiziert und für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 10 μ M des HIF-2 α -Antagonisten bzw. 1%iger DMSO-Lösung versetzt. Anschließend wurde eine automatische FRET-Zeitreihen-Messung durchgeführt, wobei die FRET-Effizienz in 4 unterschiedlichen Zellen stündlich im Intervall von 0 bis 15 h bestimmt wurde. Die Zellen wurden mit 20x Luft-Objektiv aufgenommen.

Sowohl bei der Kontrollmessung des FRETs mit DMSO als auch bei der Messung mit dem HIF-2 α -Antagonisten variierten die Werte der FRET-Effizienz für dieselbe Zelle nach ihrer stündlichen Aufnahme. Nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten lagen die FRET-Effizienz-Werte bei den 4 untersuchten Zellen im Bereich von 15 % - 22 %, 12 % - 19 %, 8 % - 21 % und 6 % - 20 %. Es erfolgte keine kontinuierliche Reduktion oder Zunahme der FRET-Effizienz nach längerer Einwirkzeit des HIF-2 α -Antagonisten. Nach Zugabe 1%iger DMSO-Lösung lagen die FRET-Effizienz-Werte der analysierten Zellen 1 bis 4 im Intervall von 6 % - 11 %, 10 % - 15 %, 14 % - 28 % und 5 % - 8 %.

Zum Vergleich wurde die Wirkung des HIF-2 α -Antagonisten auf die Interaktion von CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT untersucht. Die Interaktion zwischen HIF-1 α und ARNT wurde nach Zugabe des HIF-2 α -Inhibitors nicht beeinträchtigt (vgl. Abb. 4-11). Die FRET-Kurven wiesen nach Zugabe von 10 μ M des HIF-2 α -Antagonisten eine Sättigung auf. Dabei erreichte die Antagonist-Kurve schon bei niedrigen Akzeptorkonzentrationen ihr Plateau. Darüber hinaus

lagen die maximalen FRET-Effizienz-Werte, bei denen das Plateau erreicht wurde, nah beieinander.

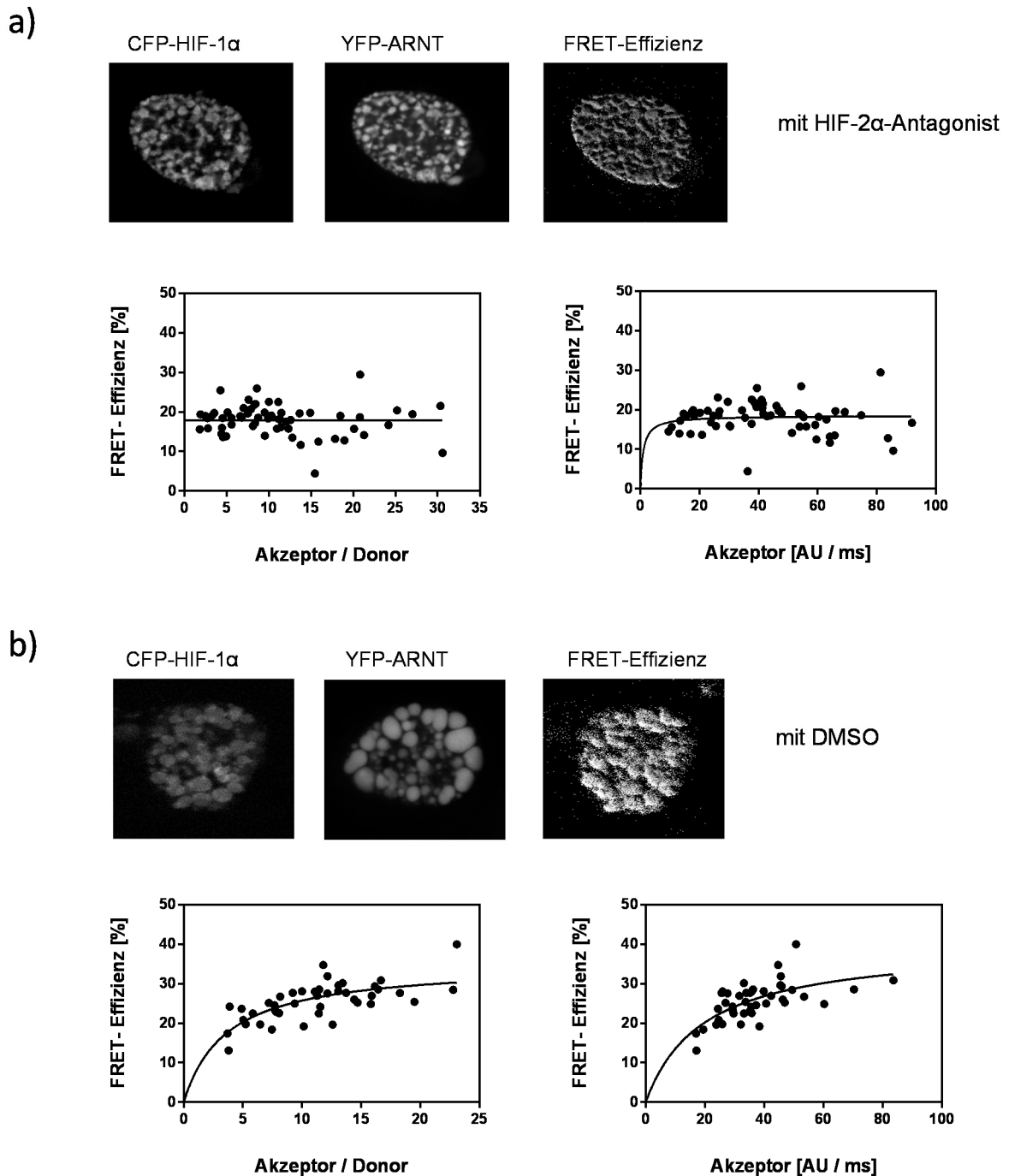
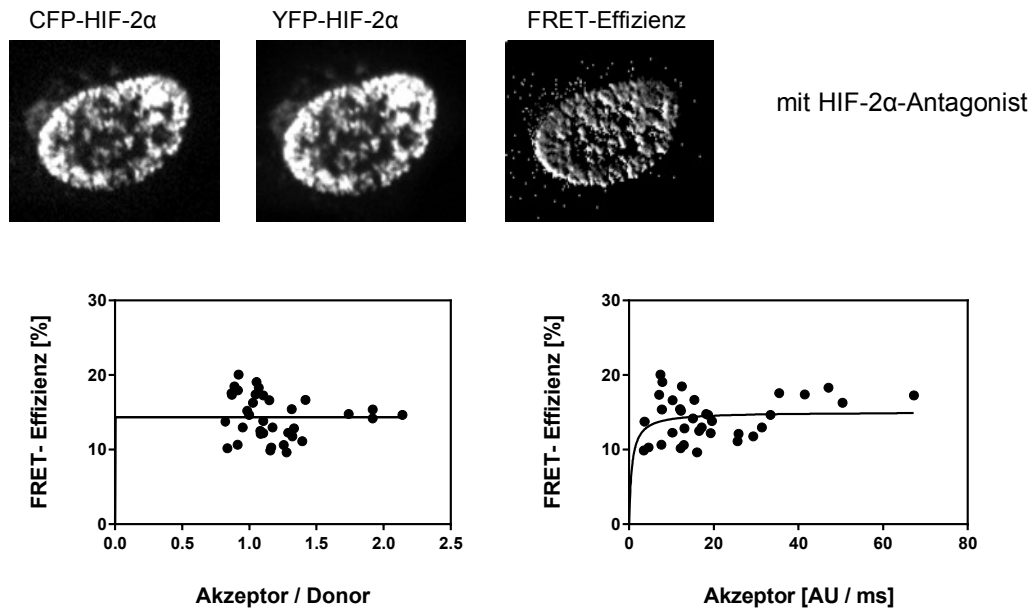


Abb. 4-11 Heterodimerisierung von HIF-1 α und ARNT nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten. Für die FRET-Messung wurden die U2OS-Zellen mit den Fusionskonstrukten CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT transfiziert und anschließend wie in Abb. 4-9 behandelt. Bei a) wurden 61 Zellen und bei b) 43 Zellen ausgewertet. Anzahl der Messungen N = 2.

Da in dieser Arbeit eine Interaktion zwischen zwei HIF-2 α -Untereinheiten durch FRET-Messungen bestätigt wurde, wurde zusätzlich die Wirkung des HIF-2 α -Antagonisten auf die Interaktion geprüft (vgl. Abb. 4-12). Es konnte keine Inhibierung der Interaktion nach der Inkubation der Zellen mit dem HIF-2 α -Antagonisten festgestellt werden.

a)



b)

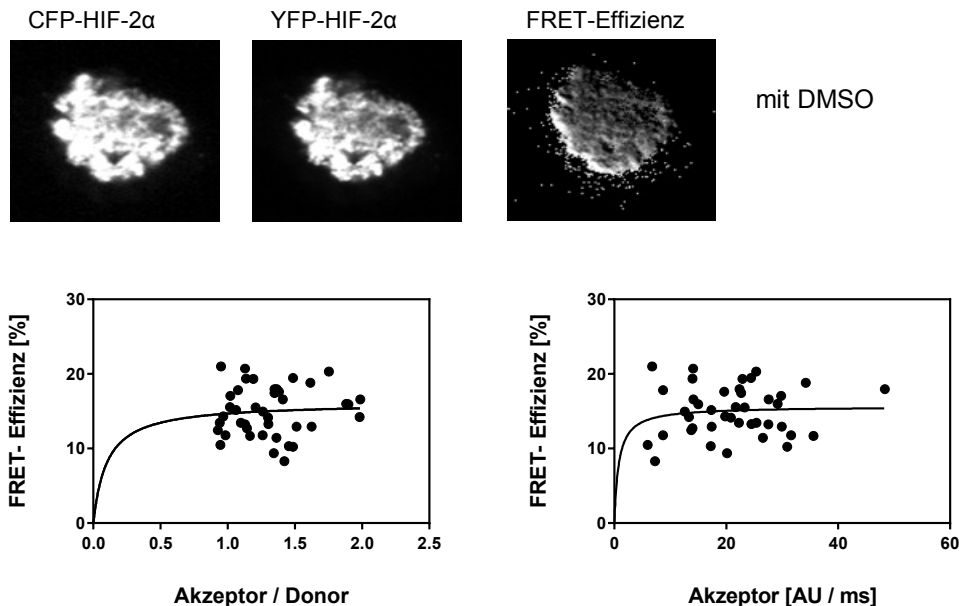


Abb. 4-12 Interaktion zwischen CFP-HIF-2 α und YFP-HIF-2 α nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten. Bei a) wurden 36 Zellen und bei b) 41 Zellen ausgewertet.

4.2.Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Um die Interaktion bzw. Bindung zwischen HIF-Untereinheiten mit einer anderen Methode neben der FRET-Methode zu analysieren, wurden Co-Immunpräzipitations-Versuche durchgeführt. Mit Hilfe der Co-IP kann eine Bindung zwischen zwei und mehreren Proteinen *in vitro* nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung der Protein-Protein-Wechselwirkungen zwei unterschiedliche Typen von Agarose-Beads verwendet: die mit dem Anti-GAL4-Antikörper (IgG_{2a}, murin monoklonal) konjugierten Agarose-Beads (*Santa Cruz Biotechnology*) und die mit dem Anti- α -GFP-Antikörper gekoppelten Agarose-Beads (*GFP-Trap_MA, Chromotek*). Der erste Typ der Agarose-Beads bindet Proteine, die mit dem Protein Gal4 fusioniert sind. Der zweite Typ bindet Proteine, die dem Fluorophor GFP (*green fluorescent protein*) oder auch mit GFP-Derivaten wie CFP (*cyan fluorescent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*) gekoppelt sind. Die Gal4- bzw.CFP-gekoppelten Fusionsproteine dienten hier als „Köderproteine“, die an den jeweiligen Typ der Agarose-Beads binden und dadurch seine Interaktionspartner, die sog. „Beuteproteine“, aus dem gesamten Proteingemisch der Zellen mitpräzipitieren können. In dieser Arbeit wurden folgende Proteinpaaire mit Hilfe der Co-IP untersucht: Gal4-HIF-2 α und HA-HIF-1 α bzw. Gal4-HIF-2 α und HA-HIF-1 α , CFP-HIF-1 α und HA-HIF-2 α , CFP-ARNT und HA-HIF-2 α sowie CFP-HIF-2 α und HA-HIF-2 α nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten bzw. DMSO.

4.2.1. Interaktionsanalyse zwischen HIF-1 α und HIF-2 α bzw. HIF-2 α und HIF-2 α

In dieser Arbeit deuteten FRET-Messungen in lebenden U2OS-Zellen auf eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-2 α hin. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde eine Co-Immunpräzipitations-Analyse durchgeführt. Zunächst wurde eine Interaktion zwischen den Untereinheiten Gal4-HIF-2 α und HA-HIF-1 α sowie Gal4-HIF-2 α und HA-HIF-2 α untersucht. Diese Interaktion wurde von Dr. rer. nat. Jun Hu bereits berichtet und sollte in dieser Arbeit bestätigt werden. Es wurden HA-HIF-1 α - und HA-HIF-2 α -Banden sowohl im Zelllysat als auch in den Co-IP-Proben identifiziert (vgl. Abb. 4-13). Trotz der Transfektion der gleichen Plasmid-Menge (5 μ g pro 60mm-Petrischale) wurde die Untereinheit HA-HIF-2 α viel besser exprimiert, wie die Immundetektion der Zelllysat-Proben mit dem Anti-HA-Antikörper zeigte.

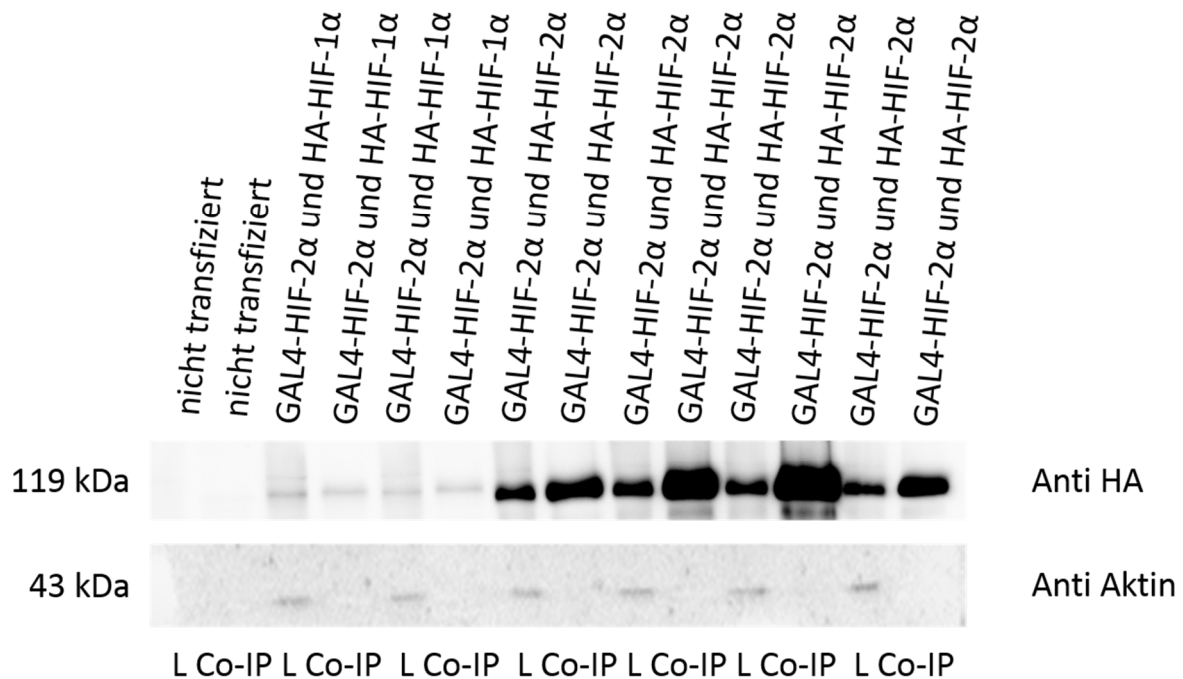


Abb. 4-13 Co-Immunpräzipitation von Gal4-HIF-2α und HA-HIF-1α bzw. GAL4-HIF-2α und HA-HIF-2α. Als L wird eine Zellysate-Probe und als Co-IP eine Co-Immunpräzipitations-Probe bezeichnet. Für die Interaktionsanalyse der HIF-Untereinheiten wurden 7×10^5 U2OS-Zellen pro eine 60mm-Pertrischale ausgesät. Nach der 24stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit den Plasmiden GAL4-HIF-2α und HA-HIF-1α bzw. GAL4-HIF-2α und HA-HIF-2α transfiziert. Nach 24-28 h wurden die Zellen lysiert und Proteine isoliert. Danach wurden 8 µl GAL4-Agarose-Beads zu den Proteinproben zugegeben und über Nacht auf einem Überkopf-Rotierer bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die SDS-PAGE und der Westernblot durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit den Antikörpern anti-HA (*Sigma-Aldrich*, polyklonal, Kaninchen) und anti-Aktin (*Cell Signaling*, polyklonal, Kaninchen). Als Negativkontrolle wurden die nicht transfizierten Zellen verwendet.

In den Co-IP-Proben wurde auch eine dicke HA-HIF-2α-Bande identifiziert. Die Transfektion einer größeren Menge des HA-HIF-1α-Plasmids als 5 µg wirkte toxisch auf die U2OS-Zellen und wurde deswegen unterlassen.

Da bei der ersten Co-IP-Methode die Interaktion zwischen HIF-1α und HIF-2α nur in zwei Fällen bestätigt werden konnte, wurde eine weitere Co-IP-Methode angewandt.

Hierfür wurden die Fusionsproteine CFP-HIF-1α und HA-HIF-2α in den U2OS-Zellen überexprimiert. Das CFP-HIF-1α diente als Köderprotein und das Fusionskonstrukt HA-HIF-2α als „Beuteprotein“, das im Falle einer bestehenden Interaktion mit CFP-HIF-1α auch im Eluat der Agarose-Beads (*GFP-Trap_MA*, *ChromoTek*) identifiziert werden sollte. Das „Beuteprotein“ wurde in doppelter Menge transfiziert, damit den „Köderprotein“-Molekülen möglichst viele „Beuteprotein“-Moleküle zur Verfügung stehen. Nach der Durchführung des

Westernblots und der Immundetektion mit spezifischen Antikörpern konnten CFP-HIF-1 α und HA-HIF-2 α in den Co-IP-Proben identifiziert werden (vgl. Abb. 4-14).

In den Zelllysats-Proben konnte das Fusionsprotein CFP-HIF-1 α nicht detektiert werden, während die starke Expression des HA-HIF-2 α deutlich zu sehen war.

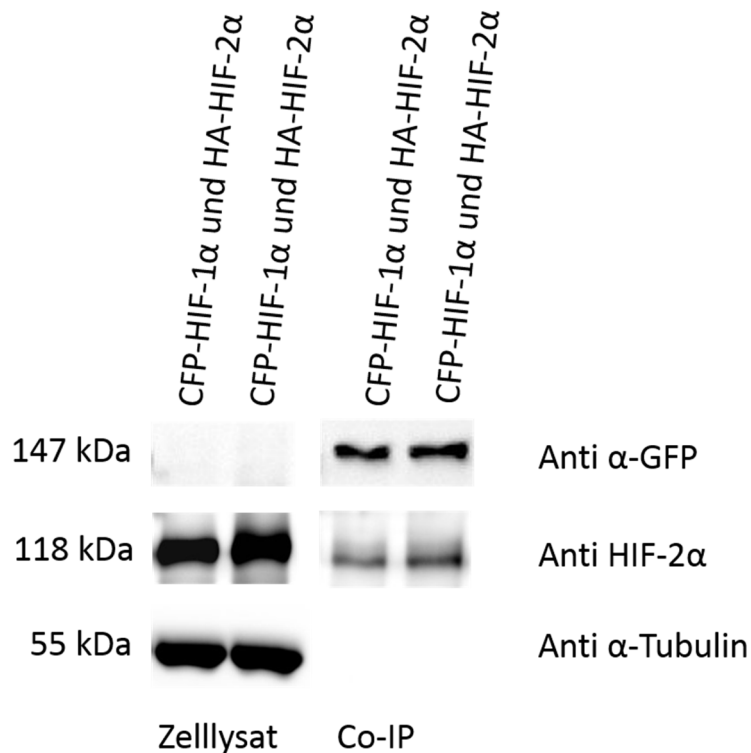


Abb. 4-14 Co-Immunpräzipitation von Untereinheiten HIF-1 α und HIF-2 α . 2×10^5 U2OS-Zellen wurden pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CFP-HIF-1 α und HA-HIF-2 α im Verhältnis 1 μ g zu 2 μ g transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression von CFP-HIF-1 α mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops überprüft. Des Weiteren wurden die Zellen lysiert und Proteine isoliert. Die Proteine wurden mit Agarose-Beads (*GFP-Trap_MA*, *ChromoTek*) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und nach der Durchführung des Westernblots mit den spezifischen Antikörpern Anti- α -GFP (*ChromoTek*, monoklonal, Ratte), HIF-2 α (*Novus*, polyklonal, Kaninchen) und α -Tubulin (*Santa Cruz*, monoklonal, murin) detektiert.

4.2.2. Die Wirkung des HIF-2 α -Antagonisten auf die HIF-2 α / ARNT und HIF-2 α / HIF-2 α -Interaktion

Für die Co-Immunpräzipitations-Versuche wurden die Osteosarcom-Zellen U2OS mit dem CFP-gekoppelten ARNT-Plasmid und HA-gekoppelten HIF-2 α -Plasmid im Verhältnis 1 μ g zu 2 μ g transfiziert. Die Expression des CFP-ARNTs konnte mittels der Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden.

Die Ergebnisse der Immundetektion des Zelllysats zeigten, dass CFP-ARNT und HA-HIF-2 α in den U2OS-Zellen exprimiert werden konnten (vgl. Abb. 4-15). Da die U2OS-Zellen mit der doppelten DNA-Menge des HA-HIF-2 α -Plasmids transfiziert worden waren, war dementsprechend die Expression des Proteins viel stärker. Um auszuschließen, dass HA-HIF-2 α an das CFP-Protein binden kann, wurden die U2OS-Zellen mit dem CFP-Leervektor, der nur für das CFP allein kodiert, und dem HA-HIF-2 α -Plasmid transfiziert. Die Expression der beiden Proteine wurde in der Zelllysats-Probe nachgewiesen. In der Co-IP-Probe wurde eine große CFP-Bande und keine HA-HIF-2 α -Bande identifiziert. Das bedeutet, dass das Protein HA-HIF-2 α nicht durch das CFP allein mitpräzipitiert werden kann. Dadurch konnte ein falschpositives Ergebnis, das im Falle einer Bindung von HA-HIF-2 α an CFP entstünde, ausgeschlossen werden. In der Proteinprobe mit den nicht transfizierten U2OS-Zellen, die als Negativkontrolle diente, waren wie erwartet keine Banden der zu untersuchenden Proteine zu sehen.

Mit Hilfe der Co-IP wurde die Interaktion zwischen HIF-2 α und ARNT in der Positivkontrollprobe mit DMSO bestätigt.

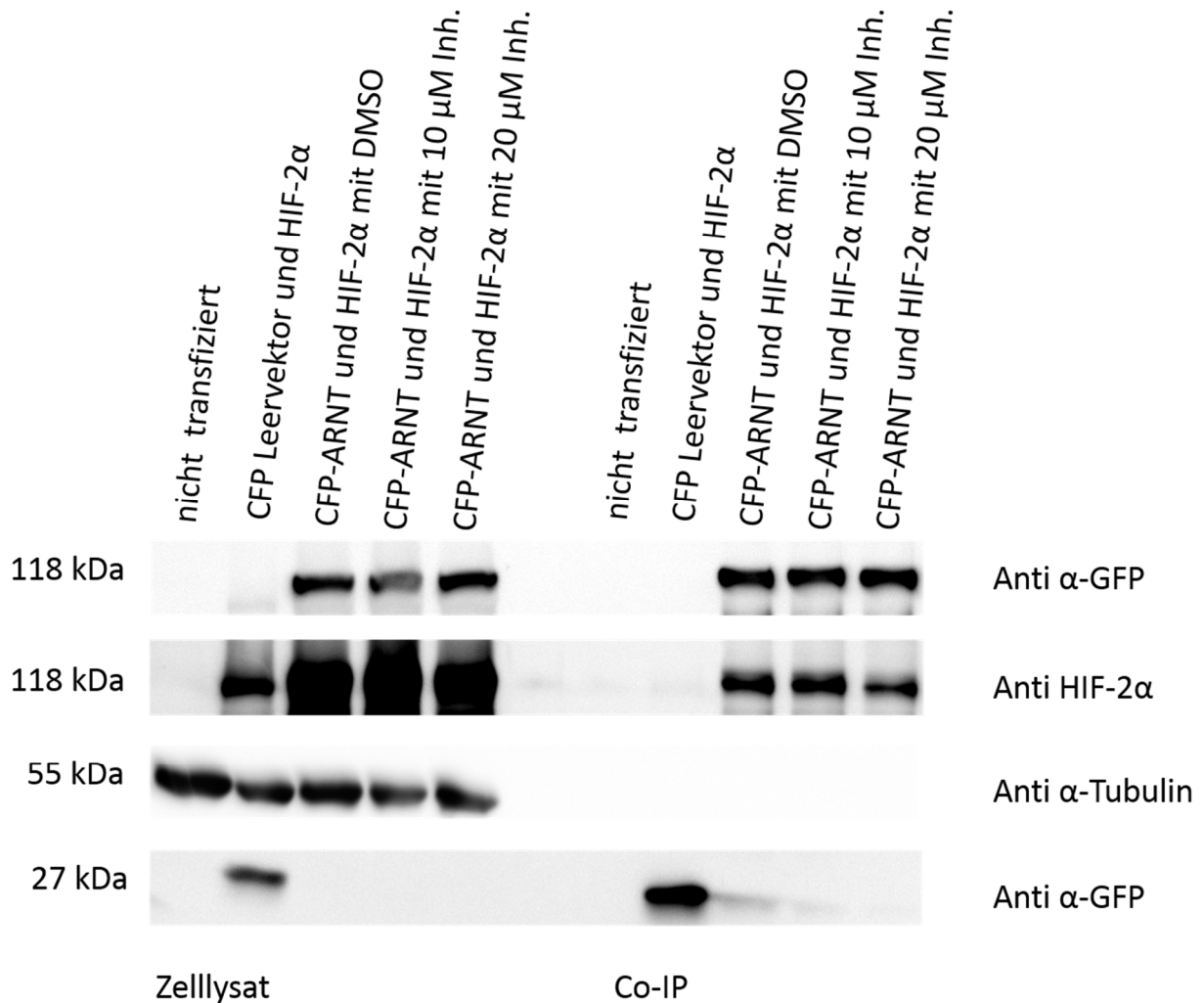


Abb. 4-15 Co-Immunpräzipitation von HIF-2α und ARNT nach Zugabe des HIF-2α-Antagonisten / Inhibitors (hier: Inh.). Für eine Co-Immunpräzipitation wurden 2×10^5 U2OS-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit CFP-ARNT und HA-HIF-2α im Verhältnis 1 μg zu 2 μg transfiziert. Nach 28-30 h wurden die Zellen mit 1 % DMSO, 10 μM bzw. 20 μM des HIF-2α-Antagonists/ Inhibitors versetzt und für weitere 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Des Weiteren wurden die Zellen lysiert und die Proteinkonzentration wurde bestimmt. Anschließend wurde 4 μl GFP-gekoppelte Agarose-Beads je eine Proteinprobe hinzugegeben und die Proben wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotierer inkubiert. Die an die Agarose-Beads gebundenen Proteine wurden nach dem Protokoll eluiert und auf ein 7,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten die nicht transfizierten Zellen und die Zellen, bei denen der CFP-Leervektor und das HA-HIF-2α überexprimiert wurden. Die Immundetektion der Proteine erfolgte mit den Antikörpern Anti-α-GFP (ChromoTek, monoklonal, Ratte), Anti-HIF-2α (Novus, polyklonal, Kaninchen) und Anti-α-Tubulin (Santa Cruz, monoklonal, murin).

Die Interaktion zwischen HIF-2α und ARNT wurde auch nach Zugabe von 10 μM des HIF-2α-Antagonisten nicht unterbrochen.

Nach der Auswertung von drei Versuchsergebnissen mit dem Bildbearbeitungs-Programm *ImageJ* wurde eine Tendenz zur Reduktion der Co-Immunpräzipitations-Effizienz von HIF-2 α um ca. 22 % festgestellt (vgl. Abb. 4-16).

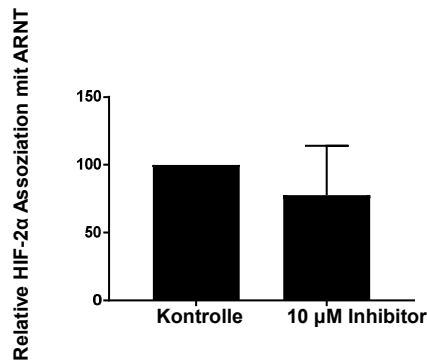


Abb. 4-16 Relative Co-Immunpräzipitations-Effizienz von HIF-2 α nach Zugabe von 10 μ M des HIF-2 α -Inhibitors. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM. Anzahl der Versuche N = 3.

Für die Co-Immunpräzipitations-Analyse der Untereinheiten HIF-2 α und ARNT wurde zusätzlich eine höhere Konzentration des HIF-2 α -Antagonisten von 20 μ M getestet. Bei der Proteinprobe mit 20 μ M konnte eine Reduktion der Menge des mitpräzipitierten HA-HIF-2 α -Proteins in der Co-IP-Probe festgestellt werden. Allerdings war die Menge der exprimierten HA-HIF-2 α -Untereinheit in der Zelllysats-Probe im Vergleich zur DMSO- und 10 μ M-Zelllysats-Probe ebenfalls reduziert. Darüber hinaus wiesen die transfizierten U2OS-Zellen nach der 18stündigen Inkubation mit 20 μ M des HIF-2 α -Antagonisten eine veränderte Morphologie auf. Einige Zellen lösten sich aus dem Monolayer ab.

Als Nächstes wurden die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen HIF-2 α -Untereinheiten analysiert. Für die Co-IP-Untersuchung wurden die Osteosarcom-Zellen U2OS mit den Fusionsplasmiden CFP-HIF-2 α und HA-HIF-2 α transfiziert. Die beiden Proteine wurden in den Zellen exprimiert, wie die Zelllysats-Proben bestätigten (vgl. Abb. 4-17). Mit Hilfe der Co-IP konnte die Interaktion zwischen den beiden HIF-Untereinheiten nachgewiesen werden.

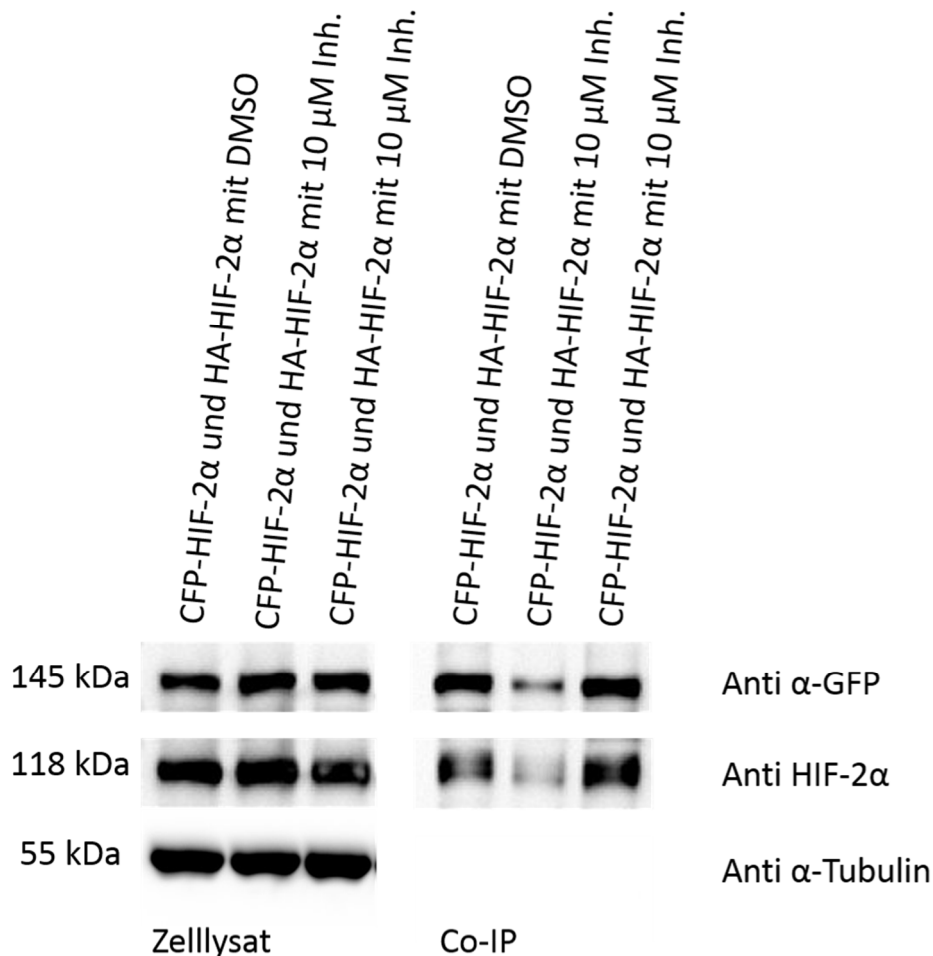


Abb. 4-17 Co-Immunpräzipitation von HIF-2α-Untereinheiten nach Zugabe des HIF-2α-Antagonisten (hier: Inh.). Für die Co-IP-Analyse wurden 2×10^5 U2OS-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CFP-HIF-2α und HA-HIF-2α im Verhältnis 1 μg zu 2 μg transfiziert. Nach 28-30 h wurde das DMEM-Nährmedium gewechselt und die Zellen wurden mit 10 μM des HIF-2α-Antagonisten / Inhibitors bzw. mit 1%iger DMSO-Lösung versetzt. Nach 18 h erfolgte die Lyse der Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben. Anschließend wurden die Proteinproben mit 4 μl Agarose-Beads (GFP-Trap_MA, ChromoTek) je Proteinprobe versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotierer inkubiert. Danach wurden die Agarose-Beads gewaschen und die Proteine eluiert. Anschließend wurde die SDS-PAGE und der Westernblot durchgeführt. Die Immundetektion erfolgte mit den Antikörpern Anti-α-GFP (ChromoTek monoklonal, Ratte), Anti-HIF-2α (Novus, polyklonal, Kaninchen) und Anti-α-Tubulin (Santa Cruz, monoklonal, murin).

Nach Zugabe von 10 μM des HIF-2α-Antagonisten wurde die Interaktion nicht gehemmt, wie aus den Co-IP-Ergebnissen der beiden 10 μM-Proben zu sehen war. Bei der ersten Probe resultierte die geringe Menge des gebundenen HA-HIF-2α-Proteins aus der geringen Menge seines „Köderproteins“ CFP-HIF-2α. Ein großer Teil des Proteins CFP-HIF-2α zusammen mit dem gebundenen HA-HIF-2α wurde wahrscheinlich bei dem Waschen der Agarose-Beads verloren.

4.3. Genexpressionsanalyse

In humanen Osteosarcom-Zellen U2OS wird unter hypoxischen Bedingungen der Transkriptionsfaktor HIF-1 α induziert. Dagegen wird in den Zellen der Transkriptionsfaktor HIF-2 α weder unter Hypoxie noch unter Normoxie detektiert. Mit Hilfe des Zellkulturmodells wurde untersucht, ob die Überexpression von HIF-2 α einen Einfluss auf die hypoxische Induktion des HIF-1-Zielgens *Carbonische Anhydrase-IX* (CA-IX) hat. Mit Hilfe der künstlichen Überexpression von HIF-2 α in den U2OS-Zellen wurde untersucht, ob die CA-IX-Induktion dadurch beeinträchtigt wird. In diesem Experiment wurde das CFP-markierte HIF-2 α in den Zellen exprimiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit der YFP-getaggten ARNT-Untereinheit transfiziert, damit genug ARNT-Moleküle für die Bildung der Transkriptionskomplexe mit dem endogenen HIF-1 α und dem überexprimierten CFP-HIF-2 α zur Verfügung stehen. Dieser Versuch wurde von Dr. rer. nat. Jun Hu zum ersten Mal gemacht und sollte in dieser Arbeit wiederholt werden. Es konnte bestätigt werden, dass die Transfektion unterschiedlicher Mengen von HIF-2 α (Titration) zur starken Reduktion der CA-IX-mRNA-Expression führte (vgl. Abb. 4-18). Zum Vergleich wurde die Transkription des Gens *Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1* (PAI-1), die durch das HIF-2 α -Protein initiiert wird, überprüft. Wie erwartet wurde die mRNA-Expression von PAI-1 durch die Überexpression von CFP-HIF-2 α in den U2OS-Zellen induziert (vgl. Abb. 4-18). Dies bestätigte die transkriptionale Aktivität von CFP-HIF-2 α . Die PAI-1-Expression nahm mit steigender CFP-HIF-2 α -Konzentration zu, allerdings war die Expression nach der Transfektion von 1,2 μ g CFP-HIF-2 α niedriger als bei 0,3 und 0,6 μ g CFP-HIF-2 α .

Um festzustellen, ob die Überexpression des Fusionsproteins CFP-HIF-2 α einen Einfluss auf die Hypoxie-induzierbare Expression des endogenen HIF-1 α -Proteins in den U2OS-Zellen hatte, wurden die transfizierten Zellen nach der Inkubation bei 1 % O₂ lysiert und Proteine isoliert. Aus der Abb. 4-18 ist ersichtlich, dass das endogene HIF-1 α -Protein in allen Proben, die der Hypoxie (1 % O₂, 6 h) ausgesetzt wurden, identifiziert werden konnte. Allerdings war die Expression des endogenen HIF-1 α -Proteins nach der Überexpression von 0,6 und 1,2 μ g CFP-HIF-2 α reduziert. Die unter Normoxie (21 % O₂) inkubierten Zellen wiesen wie erwartet kein HIF-1 α auf. Als Referenzprotein diente α -Tubulin, das sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie in den Zellen exprimiert wird.

Das für diesen Versuch verwendete Plasmid enthielt nicht die letzte Aminosäure in der Proteinsequenz Thr870 und einen Stopcodon. Die Thr870-Deletion verhinderte die transkriptionale Aktivität der CFP-HIF-2 α -Untereinheit nicht, weil die mRNA-Expression des

HIF-2-spezifischen Zielgens PAI-1 erfolgreich induziert wurde. Trotzdem muss das Ergebnis mit dem CFP-HIF-2 α -Protein mit vollständiger Aminosäuresequenz wiederholt werden.

Zusätzlich wurde analysiert, ob die Überexpression des transkriptionell inaktiven HIF-2 α -Proteins, bei dem die DNA-bindende Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH-Domäne) deletiert worden ist, auch einen inhibitorischen Effekt auf die CA-IX-Induktion wie die Überexpression von HIF-2 α mit vollständiger Aminosäuresequenz hat. Die bHLH-Domäne ist unentbehrlich für die Bindung des Transkriptionsfaktors HIF-2 α an die HRE- (*hypoxia response elements*) Sequenz der DNA und somit für die Einleitung der Transkription. In der Abb. 4-19 ist zu sehen, dass eine Verminderung der CA-IX-mRNA-Expression erst nach der Transfektion von 1,2 μ g CFP-HIF-2 α Δ bHLH erfolgt. Nach der Transfektion von 0,3 und 0,9 μ g CFP-HIF-2 α Δ bHLH war die CA-IX-mRNA-Expression sogar höher als in der hypoxischen Probe ohne das Protein (0 μ g). Der Wert für die CA-IX-mRNA-Expression nach Zugabe von 0,6 μ g CFP-HIF-2 α Δ bHLH wurde aufgrund großer Abweichungen bei der Evaluation der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Die endogene HIF-1 α -UE konnte auch nach der Überexpression von CFP-HIF-2 α Δ bHLH in den U2OS-Zellen detektiert werden (Abb. 4-19). Nach der Überexpression von CFP-HIF-2 α Δ bHLH wurde die Expression des endogenen HIF-1 α -Proteins nicht reduziert.

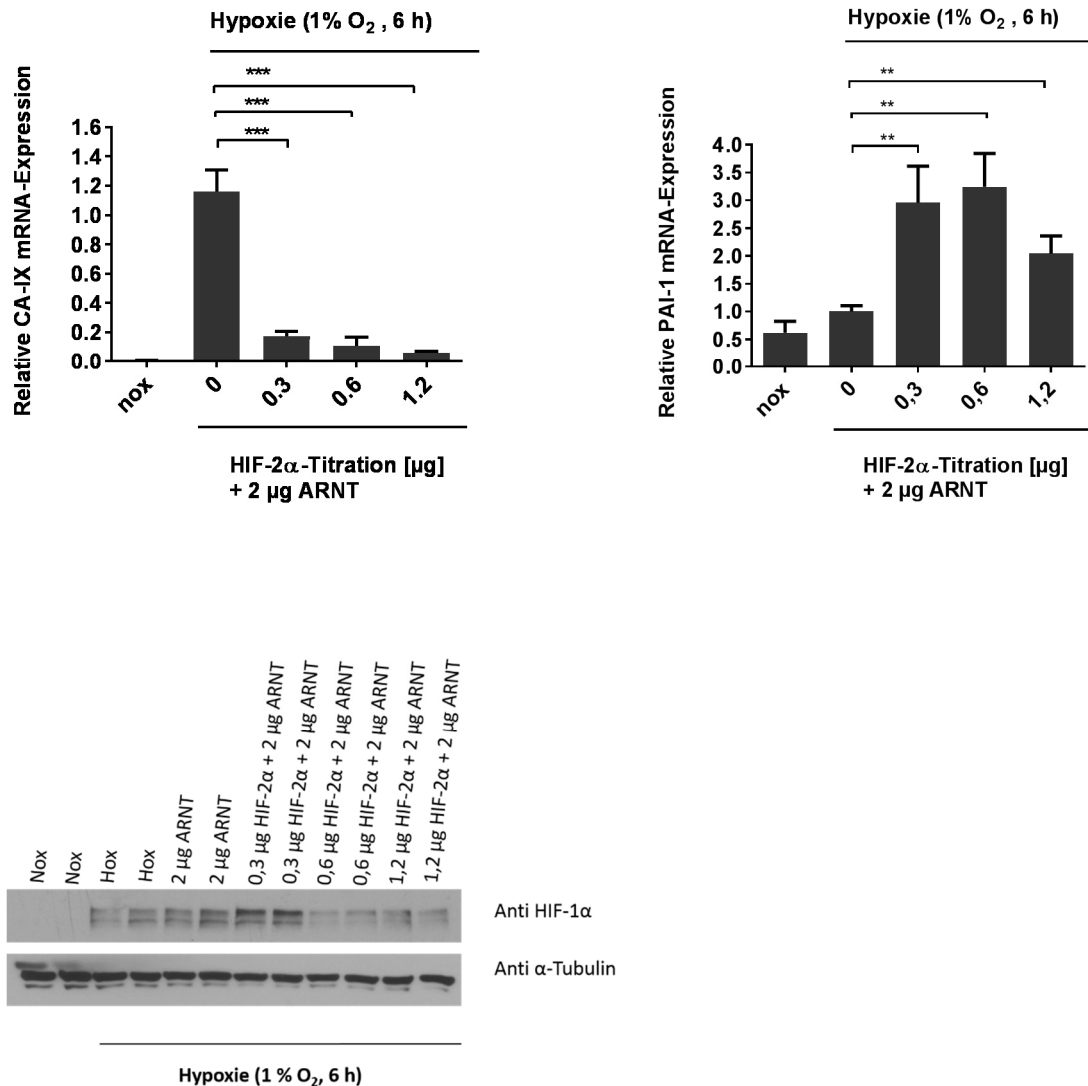


Abb. 4-18 Bestimmung des CA-IX- und PAI-1-Gens und Immundetektion des endogenen HIF-1α-Proteins nach der Überexpression des Fusionsproteins CFP-HIF-2α ΔThr870 in U2OS-Zellen. Für die Genexpressionsanalyse wurden 2×10^5 U2OS-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 2 μg YFP-ARNT und 0,3; 0,6; und 1,2 μg CFP-HIF-2α. Nach 24 h wurde die Expression von YFP-ARNT und CFP-HIF-2α mittels Fluoreszenzmikroskopie geprüft und danach wurden die Zellen für 6 h bei 1 % O₂ inkubiert. Folglich erfolgte die mRNA-Isolierung mit der Phenol-Chlorophorm-Methode und die Bestimmung der Genexpression mit der qPCR. Als Positivkontrolle dienten die U2OS-Zellen, die nur mit 2 μg YFP-ARNT transfiziert wurden. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte U2OS-Zellen, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus dreifacher Bestimmung \pm SEM.

Für die Immundetektion des endogenen HIF-1α wurden die U2OS-Zellen mit CFP-HIF-2α wie oben beschrieben transfiziert und bei 1 % O₂ für 6 h inkubiert. Des Weiteren wurden die Zellen lysiert und Proteine isoliert. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und nach der Durchführung des Westernblots mit den Antikörpern Anti-HIF-1α (*BD Biosciences*, murin, monoklonal) und α-Tubulin (*Santa Cruz*, murin, monoklonal) detektiert. Nox steht für Normoxie und Hox für Hypoxie.

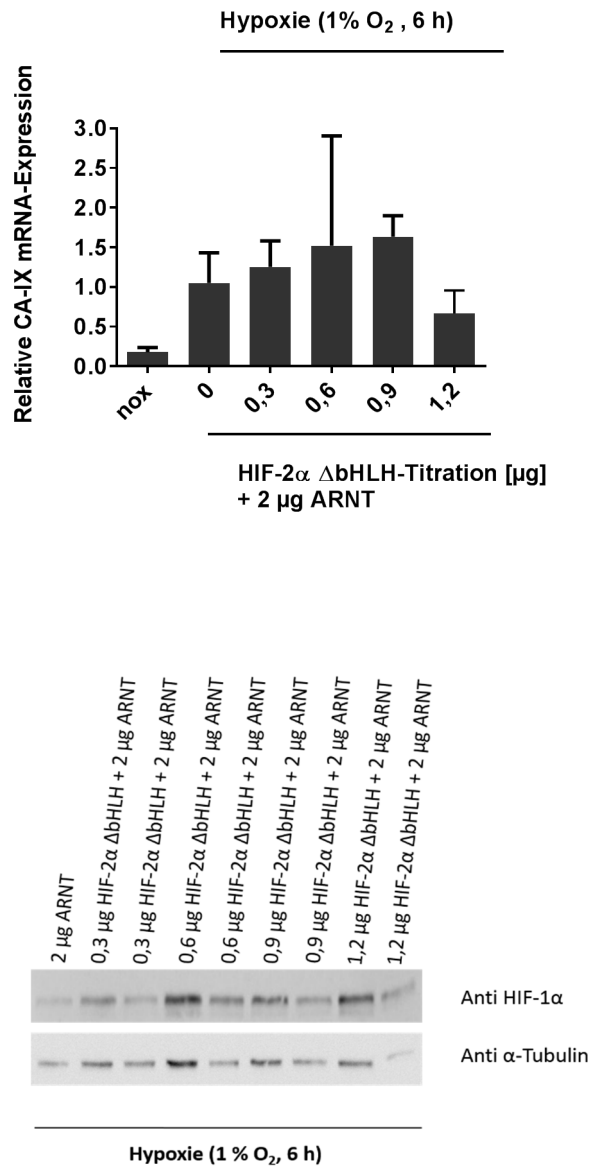


Abb. 4-19 Expression des CA-IX-Gens und Immundetektion des endogenen HIF-1α-Proteins nach der Überexpression des Fusionsproteins CFP-HIF-2α mit deletierter bHLH-Domäne in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden für die Genexpressionsanalyse sowie Bestimmung der Expression des endogenen HIF-1α-Proteins wie in Abb. 4-18 beschrieben behandelt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM (N = 5 bei nox und 0 μ g CFP-HIF-2α Δ bHLH, N = 4 bei 0,3 μ g, 0,6 μ g und 1,2 μ g CFP-HIF-2α Δ bHLH sowie N = 3 bei 0,9 μ g CFP-HIF-2α Δ bHLH).

5. Diskussion

Ein niedriger Sauerstoff-Partialdruck (Hypoxie) im arteriellen Blut und in den Geweben kann sowohl aufgrund der physiologischen als auch pathophysiologischen Prozesse im Organismus entstehen (Harris 2002). Ein Beispiel für die sog. physiologische Hypoxie ist die frühe Embryonalentwicklung, bei der der Sauerstoff-Gehalt im Gewebe wegen der schnellen Zellproliferation und des hohen Sauerstoff-Verbrauchs des wachsenden Embryos gering ist. Unter hypoxischen Bedingungen werden die sog. Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIFs) in Zellen aktiviert, die im Zellkern an die DNA binden und eine Genexpression auslösen. Die HIFs sind in der Gewebebildung inherent und an der Regulation der Stammzellfunktion beteiligt (Imanirad und Dzierzak 2013).

Zu den pathologischen Prozessen, bei denen Hypoxie auftritt, zählen z. B. Tumorprozesse. Beide HIF- α -Untereinheiten regulieren Gene, die an der Tumor-Angiogenese und -Differenzierung sowie Metastasierung beteiligt sind. Eine erhöhte Expression beider HIF- α -UE ist in soliden Brust-, Kolon-, Lungen- und Hirntumoren vorhanden. Der Transkriptionsfaktor HIF-2 α wird oft in soliden Tumoren exprimiert und ist für die Transkription mehrerer Metastasierung-fördernder Gene, wie z. B. *CXCR4*, *LOX* oder *TWIST1*, verantwortlich (Patel und Simon 2008). Die Transkription des Gens *CXCR4*, das für den Chemokinrezeptor codiert, wird von HIF-2 α im Nierenzellkarzinom induziert. Das Enzym *LOX* wurde in Brust- und Kopf-Hals-Karzinomen identifiziert und der Transkriptionsfaktor *TWIST1* ist ein Schlüsselregulator der Tumor-assoziierten Fibroblasten, die unmittelbar eine maligne Progression fördern (Lee *et al.* 2015).

Angesichts der beschriebenen Rolle der HIF-2 α -UE in Tumorprozessen befassen sich immer mehr Forschungsprojekte mit der Entwicklung molekularer HIF-2 α -Inhibitoren.

5.1. Der Einfluss von Mutationen in der HIF-2 α -Untereinheit auf die Interaktion mit ARNT

Deletionen und Mutationen in der HIF-2 α -Untereinheit können die Interaktion mit ARNT beeinträchtigen oder gar unterbrechen. Die Unterbrechung der HIF-2 α / ARNT-Interaktion wurde durch die Messungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers zwischen CFP-HIF-2 α mit deletierter PAS-Domäne und YFP-ARNT (vgl. Abb. 4-3) sowie zwischen CFP-HIF-2 α mit den Punktmutationen Gln322Glu, Met338Glu und Tyr342Thr in der PAS-B-Domäne und YFP-ARNT (vgl. Abb. 4-4) bestätigt. Dagegen hatte die Punktmutation Cys138Tyr in der PAS-A-Domäne und das Fehlen der Aminosäure Threonin an der Position 870 (Thr870) sowie des Stopcodons in der HIF-2 α -Untereinheit keinen Einfluss auf die Interaktion mit ARNT, wie die FRET-Messungen zeigten (vgl. Abb. 4-5 und Abb. 4-6).

Diese Beispiele belegen, dass die Lokalisation von Mutationen bzw. Deletionen für die HIF-2 α / ARNT-Dimerisierung eine entscheidende Rolle spielt. Die PAS-Region in der HIF-2 α -Untereinheit ist essentiell für die Bildung des HIF-2 α / ARNT-Heterodimers (Semenza *et al.* 1997). Die Aminosäurereste Gln322, Met338 und Tyr342 befinden sich in der HIF-2 α -PAS-B-Domäne, an der Solvens-exponierten Oberfläche des β -Faltblatts, das direkt mit dem β -Faltblatt von der ARNT-PAS-B-Domäne interagiert (Erbel *et al.* 2003). Deswegen ist es nicht verwunderlich, dass der Ersatz dieser Aminosäurereste die Interaktion mit ARNT behinderte. Hingegen hatte die zufällig aufgetretene Punktmutation in der PAS-A-Region keinen Einfluss auf die Bildung des HIF-2 α / ARNT-Heterodimers, wie die FRET-Messungen zeigten.

Die Aminosäure Thr870 befindet sich in der C-terminalen Transaktivierungs-Domäne, die neben der N-terminalen Transaktivierungs-Domäne für die Transkription Hypoxie-induzierbarer Gene verantwortlich und nicht an der HIF-2 α / ARNT-Dimerisierung beteiligt ist. Anscheinend wird durch die Punktmutation Cys138Tyr sowie Deletion von Thr870 auch keine Konformationsänderung des Fusionsproteins CFP-HIF-2 α verursacht, die den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer behindern könnte.

5.2. Interaktion zwischen HIF-1 α und HIF-2 α

Die Messungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers deuteten auf eine Interaktion zwischen den beiden α -Untereinheiten hin. Die FRET-Effizienz war nicht direkt proportional zu der Akzeptor-Konzentration (YFP- HIF-2 α) und eine Sättigung der Kurven war zu erkennen (vgl. Abb. 4-7). Schon bei niedrigen Akzeptorkonzentrationen von 20-30 AU/ms lag die FRET-Effizienz bei den meisten Messwerten bei 10 % und höher.

Mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation war die HIF-1 α / HIF-2 α -Interaktion schwer nachzuweisen. Es wurden mehrere Co-IP-Versuche durchgeführt, wobei zwei unterschiedliche Co-IP-Methoden angewandt wurden.

Bei dem Co-IP-Assay, bei dem die anti-Gal4-Agarose-Beads verwendet wurden, wurde die HIF-1 α -Untereinheit als ein HA-HIF-1 α -Fusionskonstrukt in den U2OS-Zellen exprimiert. In zwei Co-IP-Versuchen wurde eine HA-HIF-1 α -Bande in den Co-IP-Proben nachgewiesen (vgl. Abb. 4-13).

Bei dem Co-IP-Verfahren mit den anti-GFP-Agarose-Beads wurde ein CFP-HIF-1 α - und HA-HIF-2 α -Fusionskonstrukt exprimiert. Es konnten CFP-HIF-1 α und HA-HIF-2 α in den Co-IP-Proben identifiziert werden, aber das CFP-HIF-1 α -Protein wurde in der Probe, die das gesamte Zelllysate enthielt, nicht nachgewiesen (vgl. Abb. 4-14). Dies lag vermutlich daran, dass CFP-HIF-1 α nicht so stark in den Zellen exprimiert und der größte Teil des exprimierten Fusionskonstrukts für die Co-IP-Probe entnommen wurde. Wie in Abschn. 3.2.3.1 beschrieben wurde, wurden die mit den o. g. Fusionskonstrukten transfizierten Zellen lysiert und in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, der den gesamten Proteinpool der Zellen enthielt, abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe wurden 10 % des gesamten Proteinpools für die SDS-PAGE eingesetzt. Der Rest wurde für die Co-IP-Analyse verwendet. Da für die SDS-PAGE die Proteine in denaturierter Form vorliegen müssen, wurde der 4 \times SDS-Puffer zu der Probe mit dem gesamten Proteinpool (Zelllysate) zugegeben. Dies führte zur Verdünnung der CFP-HIF-1 α -Konzentration, die vermutlich unter der Detektionsgrenze lag.

Die Untereinheit HIF-1 α war schwer in großer Menge zu exprimieren, wenn sie nicht durch die zusätzliche Expression von ARNT stabilisiert wurde, wie bei den FRET-Messungen zwischen HIF-1 α und ARNT. Die Stabilisierung erfolgte vermutlich aufgrund der Komplex-Bildung mit ARNT. Wurden zur Interaktionsanalyse nur die beiden α -Untereinheiten exprimiert, war das Expressionslevel von HIF-1 α deutlich niedriger.

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mittels Co-IP sollte die Expression der gewünschten Proteine stark sein, um die Bindung der Proteine detektieren zu können. D. h., die Transfektionseffizienz sollte in vielen Zellen hoch sein, denn bei dem Co-IP-Assay wird das gesamte Zelllysate analysiert. Für die Co-IP wurden die U2OS-Zellen mit 5 µg HA-HIF-1α-Plasmid pro eine 60mm-Petrischale transfiziert. Eine größere Menge des Plasmids wäre toxisch für die Zellen.

Die schwächere Expression der HIF-1α-Untereinheit im Vergleich zu HIF-2α wurde auch bei den FRET-Experimenten mit den Fusionsplasmiden CFP- bzw. YFP-HIF-1α beobachtet. Aus diesem Grund wurde für die FRET-Analyse die HIF-1α-Untereinheit bevorzugt als Donor (CFP-HIF-1α) verwendet, denn für den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer müssen mehr Akzeptor-Moleküle als Donor-Moleküle zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zur Co-IP-Analyse war für die FRET-Experimente keine so starke HIF-1α-Expression nötig, denn bei einer FRET-Messung wird die Interaktion pro Zelle untersucht. D. h., es werden die Zellen mit ausreichender CFP-HIF-1α- und YFP-HIF-2α-Molekülkonzentration analysiert.

Die Schwierigkeiten bei der Detektion der HIF-1α / HIF-2α-Interaktion mittels Co-IP könnten auch aufgrund einer schwachen Bindung der beiden Untereinheiten entstanden sein. Die Co-IP-Methode umfasst mehrere Waschschrte der Agarose-Beads, an die ein Köderprotein und seine Interaktionspartner gebunden sind. Ist die Bindung zwischen den Proteinen schwach, können die Interaktionspartner durch das Waschen von den Agarose-Beads entfernt werden.

Für die weitere Analyse der HIF-1α / HIF-2α-Interaktion sollte das Hefe-Zwei-Hybrid-System ausprobiert werden. Die Methode gehört neben Co-IP und FRET zu den Standard-Methoden für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Der zusätzliche Vorteil dieser Methode gegenüber der Co-IP wäre der Nachweis der Protein-Protein-Interaktion *in vivo* (im Zellkern der Hefe). Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System müssten allerdings neue Fusionsplasmide kloniert werden.

5.2.1. Genexpression

Trotz hoher struktureller Homologie weisen die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α Sequenzunterschiede in ihren N-terminalen Transaktivierungsdomänen (N-TAD) auf. Diese Domänen sind für die Transkription HIF-1- bzw. HIF-2-spezifischer Gene verantwortlich (Hu *et al.* 2007). So wird die Expression des Gens für die Carbonische Anhydrase IX (CA-IX) ausschließlich durch HIF-1 induziert (Wykoff CC *et al.* 2000). Dieses Metalloenzym katalysiert die Hydratisierung von CO₂, wodurch das Hydrogencarbonat gebildet wird. CA-IX wird in vielen Tumortypen unter Hypoxie exprimiert (McDonald PC *et al.* 2012), auch in humanen Osteosarcom-Zellen U2OS. Dagegen wird die Expression des Gens für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) primär durch HIF-2 α reguliert (Carroll und Ashcroft 2006). PAI-1 ist ein Glycoprotein und gehört zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren (Cesari *et al.* 2010). Es inhibiert den gewebespezifischen Plasminogen-Aktivator und Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator, die in der Fibrinolyse, den Entzündungsprozessen und vielen anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind.

Um die Interaktion zwischen HIF-1 α und HIF-2 α auf mRNA-Ebene zu analysieren, wurde in den humanen Osteosarcom-Zellen U2OS, in denen unter Hypoxie endogen nur HIF-1 α induziert wird, das CFP-markierte HIF-2 α -Protein überexprimiert. Nach der HIF-2 α -Expression wurde mit Hilfe der *Real Time PCR* die Expression des HIF-1-Zielgens CA-IX und des HIF-2-Zielgens PAI-1 bestimmt.

Die dosisabhängige Reduktion der CA-IX-mRNA-Expression (vgl. Abb. 4-18) könnte aufgrund der Bindung der HIF-2 α -Untereinheit an HIF-1 α erfolgen. Im Falle der Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren aneinander, stünden weniger HIF-1 α -Moleküle für die ARNT-Moleküle zur Verfügung. Damit wäre die Heterodimerisierung von HIF-1 α mit ARNT und als Folge die Transkription HIF-1-spezifischer Gene zum Teil inhibiert. Dies könnte die verminderte CA-IX-Expression erklären. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die transkriptionale Aktivität des überexprimierten HIF-2 α -Proteins durch die Induktion der PAI-1-mRNA-Expression geprüft und bestätigt (vgl. Abb. 4-18). Trotz der bestätigten transkriptionalen Aktivität von CFP-HIF-2 α Δ Thr870 muss der Versuch mit dem CFP-HIF-2 α -Plasmid mit vollständiger Aminosäuresequenz wiederholt werden.

Für die Bindung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α an die Doppelhelix der DNA ist die bHLH-Domäne verantwortlich (Semenza *et al.* 1997, Lisy und Peet 2008). Um festzustellen, ob die transkriptionell inaktive HIF-2 α -Isoform, bei der die bHLH-Domäne

deletiert worden ist, die CAIX-mRNA-Expression auch beeinflussen bzw. inhibieren kann, wurde diese Deletionsmutante in den U2OS-Zellen überexprimiert. In diesem Fall erfolgte eine Reduktion der CA-IX-mRNA-Expression erst nach der Transfektion von 1,2 µg, der größten Plasmid-Menge der Deletionsmutante (vgl. Abb. 4-19). Dagegen bewirkte das Einbringen von 0,3 µg des Plasmids in die U2OS-Zellen einen leichten und das Einbringen von 0,9 µg einen höheren Anstieg der CA-IX-mRNA-Expression. Dieses Ergebnis zeigt einerseits, dass die bHLH-Domäne möglicherweise nötig für die Interaktion der beiden α -Untereinheiten und somit für die Inhibierung der Heterodimerisierung mit ARNT ist. Da die Helix-Loop-Helix-Domäne (HLH) an der Dimerisierung der α -Untereinheit mit ARNT teilnimmt, ist es nicht ausgeschlossen, dass die HLH-Domäne auch an der Bildung des HIF-1 α / HIF-2 α -Homodimers beteiligt ist. Wegen des Fehlens der HLH-Domäne wäre dann die Bindung zwischen HIF-1 α und HIF-2 α schwächer, weil die Homodimerisierung nur über die PAS-Domänen der beiden Proteine stattfinden könnte.

Andererseits könnte die Reduktion der CA-IX-mRNA-Expression aufgrund der Suppression der HIF-1 α -abhängigen Gentranskription durch die HIF-2 α -Überexpression in den Zellen erfolgen. Das endogene HIF-1 α könnte weniger ARNT-Moleküle zur Verfügung haben, weil diese schon einen aktiven Transkriptionskomplex mit der überexprimierten HIF-2 α -Untereinheit gebildet haben. Dies könnte erklären, warum die CA-IX-mRNA-Expression nach der Transfektion von 0,3 µg und 0,9 µg der transkriptionell inaktiven HIF-2 α -Deletionsmutante ohne die DNA-bindende Domäne nicht vermindert wurde. Allerdings wurde trotz konstitutiver und stabiler Expression der endogenen ARNT-Untereinheit zusätzlich das YFP-markierte ARNT in die Zellen transfiziert. Dadurch sollten ausreichend ARNT-Moleküle für die beiden α -Untereinheiten in den Zellen vorhanden sein.

Nach der Transfektion von 1,2 µg der Deletionsmutante wurde die CA-IX-mRNA-Expression deutlich verringert. Dies könnte für die Interaktion von HIF-1 α und HIF-2 α Δ bHLH und somit für die Inhibierung der HIF-1 α / ARNT-Heterodimerisierung oder für eine zufällige Bindung der beiden α -Untereinheiten aufgrund hoher Moleküldichte der Deletionsmutante in den Zellen sprechen. Da die mRNA-Expression von CA-IX nach der Transfektion von 0,3 und 0,9 µg der Deletionsmutante nicht reduziert wurde, scheint die letzte Variante plausibel zu sein.

5.3. Der Einfluss des HIF-2 α -Antagonisten auf die HIF-2 α / ARNT-Interaktion

Mit Hilfe des NMR-basierten Screenings zahlreicher niedermolekularer Verbindungen konnten Scheuermann *et al.* künstliche Liganden identifizieren, die selektiv an die PAS-B-Domäne von HIF-2 α binden (Scheuermann *et al.* 2009). Die identifizierten Verbindungen bestanden aus zwei substituierten aromatischen Ringen, die durch ein Linker-Molekül miteinander verbunden waren. Die Verbindung *N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-amine wurde von Scheuermann *et al.* als selektiver, allosterischer HIF-2 α -Antagonist befunden (Scheuermann *et al.* 2013). Dabei verwendeten Scheuermann *et al.* für die Durchführung des *AlphaScreen-Assays* zur Identifikation eines passenden HIF-2 α -Antagonisten mutierte PAS-B-Domänen von HIF-2 α und ARNT, die im Vergleich zu den Wildtyp-PAS-B-Domänen eine um das 100fache höhere Affinität zueinander haben (Scheuermann *et al.* 2009, Scheuermann *et al.* 2013). Die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur des Komplexes von HIF-2 α -PAS-B zusammen mit dem HIF-2 α -Antagonisten gelang ebenfalls nur mit den hochaffinen, mutierten PAS-B-Domänen. Das Vorhandensein eines ungewöhnlich großen Hohlraums in der Wildtyp-HIF-2 α -PAS-B-Domäne konnte somit nicht durch die Röntgenkristallstruktur bestätigt werden. Das Hauptziel dieser Arbeit war, die Wirkung der o. g. Verbindung (*HIF-2 α -Antagonist 2*, Sigma-Aldrich) auf die HIF-2 α / ARNT-Interaktion in lebenden humanen Zellen mittels FRET zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Co-Immunpräzipitations-Analyse durchgeführt, um die Bindung der HIF-2 α - an die ARNT-Untereinheit nach der Inkubation der Zellen mit dem HIF-2 α -Liganden zu überprüfen. Für beide Methoden wurden humane Osteosarcom-Zellen verwendet und die Endkonzentration des o. g. HIF-2 α -PAS-B-Liganden im Zellkultur-Medium betrug 10 μ M. Der HIF-2 α -Antagonist wurde in DMSO gelöst, wobei die Endkonzentration von DMSO im Zellkultur-Medium 1 % betrug. Sowohl für die FRET-Experimente als auch Co-IP-Analyse wurden Fusionsplasmide verwendet, die für die Wildtyp-HIF-Untereinheiten codieren. In dieser Arbeit wurde die antagonisierende Wirkung dieser Verbindung auf die HIF-2 α / ARNT-Heterodimerbildung durch die FRET-Messungen nicht bestätigt. Bei den FRET-Messungen wurde keine direkt proportionale Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der Akzeptor-Konzentration festgestellt (vgl. Abb. 4-9). Wie bei einer spezifischen Interaktion zwischen zwei Proteinen wiesen die FRET-Kurven sowohl nach der Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten als auch der 1%igen DMSO-Lösung einen Plateau-Bereich auf. Bei manchen Kurven war nur der Plateau-Bereich zu sehen, weil das FRET-Signal schon bei niedrigen

Akzeptor-Konzentrationen und Akzeptor / Donor-Verhältnissen der maximalen FRET-Effizienz entsprach. Die Fusionsproteine waren wie bei der Positivkontrolle im Zellkern verteilt.

Da die HIF-Untereinheiten HIF-2 α und ARNT nicht nur über ihre PAS-B-Domänen, sondern auch über PAS-A und bHLH-Domänen miteinander interagieren, ist das FRET-Ergebnis nicht so unerwartet. Die Inhibierung der Interaktion von isolierten PAS-B-Domänen von HIF-2 α und ARNT (Scheuermann *et al.* 2013) führt nicht automatisch zur Inhibierung der Bindung von den beiden Proteinen mit ihren vollständigen Aminosäuresequenzen in lebenden Zellen.

Auch die Zeitreihen-Messung des FRETs zeigte im Intervall von 0 bis 15 h keine kontinuierliche Senkung der FRET-Effizienz nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten im Vergleich zur DMSO-Probe (vgl. Abb. 4-10). Die FRET-Effizienz-Werte variierten etwas nach der stündlichen Messung sowohl nach der Zugabe des Antagonisten als auch DMSO.

Der HIF-2 α -Antagonist wies keine Eigenfluoreszenz auf. Zusätzlich wurde das Emissionsspektrum der Proben mit dem HIF-2 α -Antagonisten und ohne im Wellenlängenbereich von 460 bis 645 nm, im Wellenlängen-Abstand von 5 nm, gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Messungen zeigten keinen Unterschied zwischen den Proben mit dem HIF-2 α -Antagonisten und ohne. Dadurch konnte der Einfluss des HIF-2 α -Antagonisten auf die Akzeptor-Emission (YFP-Emission) und somit die FRET-Effizienz ausgeschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob der HIF-2 α -Antagonist die Heterodimerisierung zwischen den Untereinheiten HIF-2 α und ARNT mit ihren vollständigen Aminosäuresequenzen inhibieren kann, führten Scheuermann *et al.* die Co-Immunpräzipitationsanalyse der Proteinkomplexe aus nukleären Extrakten der hypoxischen Hep3B-Zellen durch (Scheuermann *et al.* 2013). Dabei diente ARNT als das Köderprotein und HIF-2 α als sein Beuteprotein, das im Falle einer Interaktion mit ARNT mitpräzipitiert wird. Die nukleären Extrakte aus den hypoxischen Hep3B-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1; 1; 10; 30 und 100 μ M) des HIF-2 α -Antagonisten inkubiert und anschließend wurde die Co-Immunpräzipitations-Effizienz von HIF-2 α mit der DMSO-Kontrollprobe verglichen. Es wurde eine Verminderung der Co-Immunpräzipitations-Effizienz des HIF-2 α -Proteins mehr als um das Zweifache nach der Inkubation der nukleären Extrakte mit dem Antagonisten festgestellt. Allerdings erfolgte ab der Antagonisten-Konzentration von 10 μ M keine weitere Reduktion der Co-IP-Effizienz von HIF-2 α .

In dieser Arbeit wurde auch eine Co-Immunpräzipitationsanalyse (Co-IP) der Untereinheiten HIF-2 α und ARNT sowie HIF-2 α und HIF-2 α nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten durchgeführt. Bei der Untersuchung der Interaktion zwischen HIF-2 α und ARNT wurde eine Verminderung der Co-IP-Effizienz von HIF-2 α um ca. 22 % nach der Inkubation der Zellen mit 10 μ M des HIF-2 α -Antagonisten im Vergleich zur Positivkontrolle mit DMSO festgestellt (vgl. Abb. 4-16).

Die Proteinproben aus den U2OS-Zellen, die mit 20 μ M des HIF-2 α -Antagonisten behandelt wurden, wiesen eine kleinere Menge des gebundenen HIF-2 α -Proteins in den Co-IP-Proben auf. Auch die Expression des HIF-2 α -Proteins in den Zelllysat-Proben wurde nach der Zugabe von 20 μ M des HIF-2 α -Antagonisten vermindert (vgl. Abb. 4-15). Dieser inhibitorische Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Toxizität des Liganden auf die transfizierten Zellen zurückzuführen, denn manche der behandelten Zellen wiesen eine veränderte Morphologie auf und lösten sich vom Boden der 6-Well-Platte ab. Dagegen blieb die Morphologie der U2OS-Zellen nach der Behandlung mit 10 μ M des HIF-2 α -Antagonisten unverändert und die Expression des HIF-2 α -Proteins war in den Zelllysat-Proben etwas erhöht (vgl. Abb. 4-15). Dabei wurde mit Absicht der HIF-2 α -Antagonist direkt zu den lebenden Zellen gegeben und erst danach erfolgte der Zellaufschluss und die Proteinisolierung.

In den Co-IP-Experimenten von Scheuermann *et al.* wurde der HIF-2 α -Antagonist erst nach der Isolierung der nukleären Extrakte aus den hypoxischen Hep3B-Zellen zugegeben. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, warum die Behandlung mit dem HIF-2 α -Antagonisten nicht vor der Isolierung der nukleären Extrakte aus den Hep3B-Zellen erfolgte. Die Hep3B-Zellen könnten vor oder während ihrer Inkubation unter Hypoxie (1 % O₂ und 5 % CO₂) mit dem HIF-2 α -Antagonisten versetzt werden. In diesem Fall wäre der HIF-2 α -Ligand dem Zellmetabolismus ausgesetzt, dessen Rolle bei der Untersuchung potentieller therapeutischer Substanzen nicht unterschätzt werden sollte. Dabei ist nicht nur die metabolische Stabilität dieser Substanzen in einem bestimmten Zelltyp oder ihre mögliche Toxizität für die Zellen wichtig, sondern auch ihre Fähigkeit, bei den gegebenen, zelltypspezifischen Bedingungen wie z. B. die Zellteilungsrate, der pH-Wert oder die Temperatur, den zu erwarteten Effekt auszulösen. Entscheidend ist auch der Zugang des Wirkstoffs zum Wirkort. Der HIF-2 α -Antagonist muss zunächst die Zellmembran und dann die Lipiddoppelschichtmembran des Zellkerns ungehindert passieren, weil unter Hypoxie die HIF- α -UE in den Zellkern wandert. Die Inkubation der isolierten nukleären Extrakte, die HIF-2 α / ARNT-Heterodimere enthalten, mit dem HIF-2 α -Antagonisten vereinfacht künstlich den Zugang des Antagonisten zu den o. g.

Proteinkomplexen. Dies könnte eine viel stärkere Reduktion der HIF-2 α -Co-IP-Effizienz bei Scheuermann *et al.* erklären.

Sowohl die in dieser Arbeit durchgeführten Co-IP-Versuche als auch die Co-IP-Versuche von Scheuermann *et al.* wiesen keine komplette Inhibierung der Interaktion zwischen HIF-2 α und ARNT nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten nach. Mit Hilfe der FRET-Experimente wurde zum ersten Mal die Wirkung des HIF-2 α -Liganden in lebenden Zellen untersucht. In dieser Arbeit erwies sich die Verbindung *N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-amine, die in der Konzentration 10 μ M eingesetzt wurde, als unfähig, die bestehende Interaktion zwischen HIF-2 α und ARNT in lebenden Osteosarcom-Zellen zu inhibieren. Dagegen wurde eine Tendenz zur Unterbrechung der HIF-2 α / ARNT-Interaktion durch den HIF-2 α -Liganden bei Anwendung der Co-IP nachgewiesen. Bei einer Co-IP erfolgt der Nachweis in toten, aufgeschlossenen Zellen, wobei nach dem Zellaufschluss sämtliche Zellkomponenten im Lyse-Puffer vorhanden sind. Es sind also *in vitro*-Bedingungen, die physiologisch so nicht vorkommen. Anscheinend ist die Affinität des zu untersuchenden HIF-2 α -Antagonisten zur HIF-2 α -PAS-B-Domäne nicht stark genug, um die HIF-2 α / ARNT-Interaktion unter natürlichen Bedingungen zu inhibieren.

Eine höhere Konzentration war toxisch für die transfizierten U2OS-Zellen. Auch die neuen Erkenntnisse von Scheuermann *et al.* über die strukturellen Voraussetzungen der Liganden für eine hochaffine Bindung an die PAS-B-Domäne von HIF-2 α deuteten darauf hin, dass die achirale Verbindung *N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-amine nicht mit den neu synthetisierten, chiralen Verbindungen konkurrieren kann (Scheuermann *et al.* 2015). In den neuen Studien wiesen die chiralen Liganden mit zwei Stereozentren eine viel höhere Affinität für die HIF-2 α -PAS-B-Domäne auf. Außerdem führte die Besetzung der HIF-2 α -PAS-B-Domäne durch die neuen Liganden im Gegensatz zu den früher untersuchten Verbindungen zu großen Konformationsänderungen in dieser Domäne (Scheuermann *et al.* 2015). Allerdings wurde die Wirkung dieser Verbindungen auf die HIF-2 α / ARNT-Interaktion nicht in lebenden Zellen getestet. Zur Identifikation neuer HIF-2 α / ARNT-Inhibitoren mit Hilfe von AlphaScreen-Messungen sowie zur Bestimmung der Röntgenkristallstruktur von HIF-2 α -PAS-B-Domäne mit neuem Liganden wurden wieder dieselben mutierten PAS-B-Domänen verwendet. Da einzelne Punktmutationen in der PAS-B-Domäne von HIF-2 α zu signifikanten Änderungen der Interaktionsbereitschaft des Proteins mit ARNT führen können, sollten für Versuche verstärkt Wildtyp-Domänen genutzt werden. Ansonsten sollte die physiologische Relevanz bezweifelt werden. So kann der Austausch von zwei Aminosäuren

(wie Arg247Glu in der HIF-2 α - und Glu362Arg in der ARNT-PAS-B-Domäne) eine hundertfach höhere Affinität der beiden Untereinheiten zueinander und der Ersatz von drei Aminosäuren in der HIF-2 α -PAS-B-Domäne (Gln322Glu, Met338Glu und Tyr342Thr) die Unterbrechung der HIF-2 α / ARNT-Interaktion zur Folge haben.

5.4. Einfluss des HIF-2 α -Antagonisten auf die HIF-2 α / HIF-2 α -Interaktion

Sowohl die Ergebnisse der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Messungen als auch die der Co-IP wiesen auf eine Interaktion zwischen zwei HIF-2 α -Untereinheiten hin (vgl. Abb. 4-12). Die Punktmutation in der PAS-A-Sequenz sowie die Aminosäure Threonin870 in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne verhinderten die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den beiden α -Untereinheiten nicht.

Da die Verbindung *N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-amine als ein HIF-2 α -Antagonist von Scheuermann *et al.* beschrieben wurde, wurde in dieser Arbeit ihre Wirkung auf die HIF-2 α / HIF-2 α -Interaktion getestet. Die Homodimer-Bildung zwischen den beiden Untereinheiten wurde nach der Inkubation der U2OS-Zellen mit dem HIF-2 α -Antagonisten nicht beeinträchtigt, wie die FRET- und Co-IP-Ergebnisse zeigten (vgl. Abb. 4-13).

Zusammenfassung

Unter Hypoxie werden die sog. Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIFs) in Zellen aktiviert, die im Zellkern an die DNA binden und eine Genexpression auslösen. HIFs sind in verschiedene physiologische (z. B. Embryogenese) und pathophysiologische Prozesse (z. B. das Tumorwachstum und die Metastasierung) involviert (Lisy und Peet 2008).

In dieser Arbeit wurden Interaktionen von HIF-Untereinheiten durch Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) in lebenden humanen Osteosarcom-Zellen U2OS untersucht. Dafür wurden die U2OS-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Fusionsplasmiden, die für HIF-Untereinheiten codieren, transfiziert. Für eine FRET-Messung wurde eine CFP (*cyan fluorescent protein*)- und eine YFP (*yellow fluorescent protein*)-gekoppelte HIF-Untereinheit verwendet.

Das primäre Ziel des Promotionsprojekts war die Wirkung der Verbindung *N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-amine, die als ein selektiver HIF-2 α -Antagonist befunden wurde (Scheuermann *et al.* 2013), auf die HIF-2 α / ARNT-Interaktion zu prüfen. In dieser Arbeit konnte keine Inhibierung der Dimerisierung von HIF-2 α und ARNT durch FRET-Messungen in lebenden Zellen festgestellt werden. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer konnte detektiert werden und war spezifisch für zwei interagierende Proteine. Mit Hilfe der Co-Immunpräzipitations-Analyse, einer Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion *in vitro*, wurde eine Reduktion der Komplex-Bildung zwischen HIF-2 α und ARNT, jedoch keine komplette Unterbrechung des Komplexes, nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten detektiert.

Zusätzlich wurde der Einfluss von verschiedenen Mutationen in der HIF-2 α -Untereinheit auf die Dimerisierung mit ARNT untersucht. Nur ein unspezifisches FRET-Signal (*Random FRET*) wurde bei der Messung der Interaktion von HIF-2 α -Untereinheit, die drei Punktmutationen in der PAS-B-Domäne (Gln322Glu, Met338Glu, Tyr342Thr) enthielt, und ARNT detektiert. Ebenfalls führte die Deletion der ganzen PAS-Domäne in der HIF-2 α -UE zur Inhibierung der Komplex-Bildung mit ARNT. Dagegen beeinträchtigte eine Punktmutation (Cys138Tyr) in der HIF-2 α -PAS-A-Domäne sowie die Deletion von Thr870 die HIF-2 α / ARNT-Interaktion nicht.

Das spezifische FRET-Signal konnte auch zwischen den Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α sowie HIF-2 α und HIF-2 α gemessen werden. Die Co-IP-Ergebnisse lieferten eine Bestätigung der HIF-2 α / HIF-2 α -Interaktion.

Summary

Hypoxia-inducible transcription factor (HIF) complexes regulate expression of genes responsible for cellular adaptation to hypoxia. HIFs are heterodimers and consist of a labile, O₂-sensitive α -subunit and a stable β -subunit (also known as aryl hydrocarbon nuclear translocator, ARNT). Both subunits belong to the family of basic helix-loop-helix (bHLH) proteins containing a Per-ARNT-Sim (PAS) domain (Semenza *et al.* 1997).

Under hypoxia, HIF- α subunits translocate from the cytoplasm to the nucleus and form active HIF- α / ARNT heterodimers which bind to DNA and induce transcription of hundreds of genes, e. g. transcription of endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin, or glucose transporter (Fandrey *et al.* 2006).

The major aim of this research project was to investigate the impact of the compound *N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-amine, published as the selective HIF-2 α antagonist (Scheuermann *et al.* 2013), on the interaction mode of HIF-2 α and ARNT in living cells.

Additionally, the effects of mutations or deletions in the HIF-2 α subunit on its interaction with ARNT were analyzed. Moreover, the interaction of HIF-1 α and HIF-2 α was examined, hypothesizing an interplay between these two subunits.

To analyze molecular interactions of HIF subunits, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy was applied. For that purpose different plasmid constructs, fused to either enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) or enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) were transfected into human osteosarcoma cells U2OS. The FRET measurements were performed in living U2OS cells under normoxic conditions (21% O₂ and 5% CO₂).

Distinct FRET signals were detected in transfectants containing HIF-1 α and ARNT or HIF-2 α and ARNT which are known to form active heterodimers (Semenza *et al.* 1997, Tian *et al.* 1997). Only unspecific FRET characteristic for non-interacting proteins was observed in cells overexpressing the HIF subunits HIF-2 α without PAS domain and ARNT, and also HIF-2 α PAS B triple-point mutant (Gln322Glu, Met338Glu, Tyr342Thr) and ARNT.

Our FRET measurement results could not validate the disruption of HIF-2 α / ARNT interaction by the compound *N*-(3-chloro-5-fluorophenyl)-4-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-amine in living cells. A distinct FRET signal, typical for interacting proteins, could be detected. However, the co-immunoprecipitation analysis showed a little reduction of the complex formation of HIF-2 α and ARNT after addition of the compound. Nevertheless, both FRET measurements and co-immunoprecipitation analysis validated no disruption of the complex

formation. It should be taken into account that the FRET measurement findings resulted from living cells incubated under intact natural conditions.

Hypothesizing an interplay between HIF-1 α and HIF-2 α , FRET was measured in transfectants overexpressing these two proteins and a FRET signal could be detected. Moreover, the expression of HIF-1 target gene CA-IX was significantly reduced after overexpression of HIF-2 α . However, the overexpression of the transcriptionally inactive HIF-2 α subunit lacking its DNA binding domain bHLH did not impede the mRNA expression of CA-IX. Both co-immunoprecipitation assays applied in this research did not clearly show an interaction between HIF-1 α and HIF-2 α . In contrast, the interaction of two HIF-2 α subunits could be shown by co-immunoprecipitation assays.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
AlphaScreen	<i>amplified luminescent proximity homogenous assay</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
AS	Aminosäure
AU	<i>arbitrary units</i>
bHLH	<i>basic helix loop helix</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA-IX	Carbonische Anhydrase-IX
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CFP	<i>cyan fluorescence protein</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitations-Analyse
C-TAD	<i>C-terminal transactivation domain</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type4</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EPO	Erythropoietin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
FIH-1	<i>factor inhibiting HIF-1</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
Gl.	Gleichung
h	Stunden (<i>hours</i>)
HK	Hexokinase
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HRE	<i>hypoxia-responsive element</i>
HNF-4 α	<i>hepatocyte nuclear factor-4alpha</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
kDA	kilo Dalton
l	Liter
LDH-A	Lactat-Dehydrogenase A
LB-Medium	<i>Luria-Bertani broth</i> Medium
LOV2	<i>light oxygen voltage 2</i>
LOX	<i>lysyl oxidase</i>
ml	Milliliter

μl	Mikroliter
M	molar
mM	millimolar
min	Minuten
mm	Millimeter
MOP2	<i>member of the PAS superfamily 2</i>
¹⁵ N/ ¹ H HSQC	¹⁵ N/ ¹ H <i>heteronuclear single quantum correlation</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-TAD	<i>N-terminal transactivation domain</i>
Oct-3/4, Pou5fl	Oktamer-bindenden Transkriptionsfaktor 4
o. g.	oben genannt
ODD	<i>oxygen-dependent degradation domain</i>
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAS	<i>period / arnt / single minded</i>
PFK-1	Fructose-6-Phosphat Kinase
PHD	<i>prolyl hydroxylase domain containing enzymes</i>
PGK1	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>
pVHL	<i>von Hippel-Lindau protein</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur

SEM	<i>standard error of the mean</i>
sog.	so genannte
Tab.	Tabelle
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TWIST1	<i>Twist-related protein1</i>
UE	Untereinheit
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
YFP	<i>yellow fluorescence protein</i>
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Schematische Darstellung eines aktiven HIF-1 α / ARNT- bzw. HIF-2 α / ARNT-Transkriptionskomplexes.	1
Abb. 1-2 Domänenstruktur der Hypoxie-induzierbaren Faktoren.	2
Abb. 1-3 Funktion der bHLH-Domänen von HIF- α und ARNT (HIF- β).	3
Abb. 1-4 Komplex-Bildung zwischen HIF-2 α und ARNT.	4
Abb. 1-5 Sauerstoff-abhängige Regulation von HIF- α	5
Abb. 1-6 Die Sekundärstruktur-Elemente der PAS-B-Domäne von HIF-2 α	8
Abb. 1-7 Liganden für die HIF-2 α -PAS-B-Domäne.	11
Abb. 1-8 Beispiele der chiralen HIF-2 α -Inhibitoren.	11
Abb. 3-1 Restriktionsverdau durch Dpn I.	31
Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Fluoreszenz-Entstehung.	41
Abb. 3-3 Darstellung des FRETs.	42
Abb. 3-4 Absorptions- (A) und Emissions- (E) Spektren von CFP und YFP.	43
Abb. 3-5 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen zwei Proteinen, die mit CFP bzw. YFP gekoppelt sind.	44
Abb. 3-6 Schematische Darstellung der Transkriptionskomplexe HIF-1 α / ARNT und HIF-2 α / ARNT, die mit den Fluorophoren CFP bzw. YFP fusioniert sind.	46
Abb. 3-7 Darstellung einer nicht spezifischen (A, C) und spezifischen Bindung zwischen zwei Molekülen (B and D).	47
Abb. 4-1 Unspezifischer Energietransfer zwischen CFP und YFP.	51
Abb. 4-2 Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α (a) bzw. CFP-HIF-2 α (b) mit YFP-ARNT.	52
Abb. 4-3 Interaktionsanalyse zwischen CFP-HIF-2 α mit deletierter PAS-Domäne und YFP-ARNT.	54
Abb. 4-4 Interaktionsanalyse zwischen CFP-HIF-2 α mit drei Punktmutationen (hier: CFP-HIF-2 α Mutante) und YFP-ARNT.	55
Abb. 4-5 Interaktion von CFP-HIF-2 α Tyr138 Δ Thr870 Δ Stopcodon mit YFP-ARNT.	56
Abb. 4-6 Interaktion von CFP-HIF-2 α Δ Thr870 Δ Stopcodon mit YFP-ARNT.	57
Abb. 4-7 Interaktion von CFP-HIF-1 α und YFP-HIF-2 α	58
Abb. 4-8 Interaktion von CFP-HIF-2 α und YFP-HIF-2 α	59
Abb. 4-9 Interaktionsanalyse von HIF-2 α und ARNT nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten.	62
Abb. 4-10 Zeitreihen-Messungen des FRETs nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten bzw. 1%iger DMSO-Lösung.	63
Abb. 4-11 Heterodimerisierung von HIF-1 α und ARNT nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten.	64
Abb. 4-12 Interaktion zwischen CFP-HIF-2 α und YFP-HIF-2 α nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten. Bei a) wurden 36 Zellen und bei b) 41 Zellen ausgewertet.	65
Abb. 4-13 Co-Immunpräzipitation von Gal4-HIF-2 α und HA-HIF-1 α bzw GAL4-HIF-2 α und HA-HIF-2 α	67
Abb. 4-14 Co-Immunpräzipitation von Untereinheiten HIF-1 α und HIF-2 α	68
Abb. 4-15 Co-Immunpräzipitation von HIF-2 α und ARNT nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten / Inhibitors (hier: Inh.).	70
Abb. 4-16 Relative Co-Immunpräzipitations-Effizienz von HIF-2 α nach Zugabe von 10 μ M des HIF-2 α -Inhibitors.	71
Abb. 4-17 Co-Immunpräzipitation von HIF-2 α -Untereinheiten nach Zugabe des HIF-2 α -Antagonisten (hier: Inh.).	72

Abb. 4-18 Bestimmung des CA-IX- und PAI-1-Gens und Immundetektion des endogenen HIF-1 α -Proteins nach der Überexpression des Fusionsproteins CFP-HIF-2 α Δ Thr870 in U2OS-Zellen.	75
Abb. 4-19 Expression des CA-IX-Gens und Immundetektion des endogenen HIF-1 α -Proteins nach der Überexpression des Fusionsproteins CFP-HIF-2 α mit deletierter bHLH-Domäne in U2OS-Zellen.	76

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1 Zelllinien	14
Tab. 3-2 Bakterien	14
Tab. 3-3 Plasmide	15
Tab. 3-4 Kits	17
Tab. 3-5 Geräte.....	17
Tab. 3-6 Pipettieransätze für die Reverse Transkription	21
Tab. 3-7 Programm für die Reverse Transkription	22
Tab. 3-8 Pipettieransatz für die PCR.....	23
Tab. 3-9 Amplifikation eines Zielgens.....	23
Tab. 3-10 Amplifikation von β -Aktin.....	23
Tab. 3-11 Pipettieransatz für die RT-PCR	25
Tab. 3-12 Primer für die RT-PCR.....	25
Tab. 3-13 Zusammensetzung des LB-Festagars.....	26
Tab. 3-14 Zusammensetzung des LB-Mediums.....	27
Tab. 3-15 Sequenzierungs-Primer	28
Tab. 3-16 Primer für die ortsspezifische Mutagenese	30
Tab. 3-17 PCR-Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese	30
Tab. 3-18 PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese.....	31
Tab. 3-19 Restriktionsansatz mit Dpn I.....	32
Tab. 3-20 Zusammensetzung des Lyse-Puffer für Westernblot	33
Tab. 3-21 Zusammensetzung der Puffer für die Co-IP	33
Tab. 3-22 Zusammensetzung des 4× SDS-Puffers für die SDS-PAGE.....	35
Tab. 3-23 Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.....	35
Tab. 3-24 Antikörper	38

Literaturverzeichnis

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2012): *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, 4. Auflage*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 377-378

Atkins P. W. und de Paula J. (2006): *Physikalische Chemie, vierte Auflage*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 551-553

Bernardini A., Wotzlaw C., Lipinski H., Fandrey J. (2010): *An automated real-time microscopy system for analysis of fluorescence resonance energy transfer (abstract)*. Proceedings of SPIE 7723, 772311

Berra E., Ginouvès A., Pouyssegur J. (2006): *The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signaling*. EMBO 7 (1) 41-45

Carroll V. A. und Ashcroft M. (2006): *Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway*. Cancer Research 66 (12) 6264-6270

Cesari M., Pahor M., Incalzi R. A. (2010): *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions*. Cardiovascular Therapeutics 28 (5) 72-91

D'ery M. C., Michaud M.D., Richard D.E. (2005): *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37 (3) 535–540

Erbel P. J. A., Card P. B., Karakuzu O., Bruick R. K., Gardner K. H. (2003): *Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix–loop–helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor.* Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (26) 15504–15509

Fandrey J. (2007): *Molekulare Physiologie Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1.* BIOSpektrum 13. Jahrgang 26-28

Fandrey J., Gorr T. A., Gassmann M. (2006): *Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation.* Cardiovascular Research 71 (4) 642–651

Gordan J. D., Bertovrt J. A., Hu C. J., Diehl J. A., Simon M. C. (2007): *HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-Myc transcriptional activity.* Cancer Cell 11 (4) 335-347

Gu Y. Z., Moran S. M., Hogenesch J. B., Wartmann L, Bradfield C. A. (1998): *Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 α .* Gene Expression 7 (3) 205-2013

Gu Y. Z., Hogenesch J. B., Bradfield C. A. (2000): *THE PAS SUPERFAMILY: Sensors of Environmental and Developmental Signals.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology 40 519–561

Hara S., Hamada J., Kobayashi C., Kondo Y., Imura N. (2001): *Expression and Characterization of Hypoxia-InducibleFactor (HIF)-3 α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3 α .* Biochemical and Biophysical Research Communications 287 (4) 808–813

Harris A. L. (2002): *Hypoxia - a key regulatory factor in tumor growth.* Nature Reviews Cancer 2 (1) 38-47

Imanirad P. und Dzierzak E. (2013): *Hypoxia and HIFs in regulating the development of the hematopoietic system.* Blood cells, Molecules and Diseases 51 (4) 256-263

Hu C. J., Sataur A., Wang L., Chen H., M., Simon M. C. (2007): *The N-Terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α .* Molecular Biology of the Cell 18 (11) 4528–4542

Lakowicz J. R. (2006): *Principles of fluorescence spectroscopy, third edition.* Springer

Laemmli U.K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227 (5259) 680-685

Lee K. W., Yeo S. Y., Sung C. O., Kim S. H. (2015): *Twist1 is a key regulator of cancer-associated fibroblasts.* Cancer Research 75 (1) 73-85

Li K., Geraerts W. P., van Elk R., Joosse J. (1989): *Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: comparison of the AuroDye, FerriDye, and India ink staining methods.* Analytical Biochemistry 182 (1) 44-47

Lisy K. und Peet D. J. (2008): *Turn me on: regulating HIF transcriptional activity.* Cell Death and Differentiation 15 (4) 642–649

Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. (2012): *HIF-1 versus HIF-2 - Is one more important than the other?* Vascular Pharmacology 56 (5-6) 245-251

McDonald P. C., Winum J. Y., Supuran C. T., Dedhar S. (2012): *Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics.* Oncotarget 3 (1) 84-97

Mullis K. B. und Faloona F. A. (1987): *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods in Enzymology 155 335-350

O'Rourke J. F., Tian Y. M., Ratcliffe P. J., Pugh C. W. (1999): *Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial pas protein 1: Comparison with hypoxia-inducible factor α .* The Journal of Biological Chemistry 274 (4) 2060-2071

Patel S. A. und Simon M. C. (2008): *Biology of Hypoxia-Inducible Factor-2 α in Development and Disease.* Cell Death and Differentiation 15 (4) 628-634

Patterson G. H., Piston D. W., Barisas B. G. (2000): *Förster Distances between Green Fluorescent Protein Pairs*. Analytical Biochemistry 284 (2) 438–440

Renart J., Reiser J., Stark G. R. (1979): *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences 76 (7) 3116-3120

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. *Preparation and Transformation of competent E. coli*. Cold Spring Harbor laboratory Press

Scheuermann T. H., Tomchicka D. R., Machiusa M., Guo Y., Bruick R. K., Gardner K. H. (2009): *Artificial ligand binding within the HIF2 α PAS-B domain of the HIF2 transcription factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (2) 450-455

Scheuermann T. H., Li Q., Ma H. W., Key J., Zhang L., Chen R., Garcia J. A., Naidoo J., Longgood J., Frantz D. E., Tambar U. K., Gardner K. H., Bruick R. K. (2013): *Allosteric Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2 with Small Molecules*. Nature Chemical Biology 9 (4) 271-276

Scheuermann T. H., Stroud D., Sleet C. E., Bayeh L., Shokri C., Wang H., Caldwell C. G., Longgood J., MacMillan J. B., Richard K. Bruick R. K., Gardner K. H., Tambar U. K. (2015): *Isoform-Selective and Stereoselective Inhibition of Hypoxia Inducible Factor -2*. Journal of Medical Chemistry 58 (15) 5930-5941

Sekar R. B. und **Periasamy** A. (2003): *Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations*. The Journal of Cell Biology 160 (5) 629-633

Semenza G. L. (2003): *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nature Reviews Cancer 3 (10) 721-732

Semenza G. L., Agani F., Booth G., Jo Forsythe J., Iyer N., Jiang B. H., Leung S., Roe R., Wiener C., Yu A. (1997): *Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1*. Kidney International 51 (2) 553-555

Semenza G. L. (2012): *Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine*. Cell 148 (3) 399–408

Sun Y., Wallrabe H., Seo S., Periasamy A. (2011): *FRET microscopy in 2010: The legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth*. Chemphyschem 12 (3) 462-474

Takahashi Y. (2015): *Co-immunoprecipitation from transfected cells*. Methods in Molecular Biology 1278 381-389

Taylor B. L. und **Zhulin** I. B. (1999): *PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63 (2) 479–506

Teifel M. (2012): *Transfektion von Säugerzellen. Gentechnische Methoden, eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Springer 351-383

Tian H., Mcknight S. L., Russel D. W. (1997): *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes and Development 11 (1) 72-82

Voet D., Voet J. G., Pratt C. W. (2002): *Lehrbuch der Biochemie*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA 113

Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A., Semenza G. L. (1995): *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proceedings of the National Academy of Sciences 92 (12) 5510-5514

Wiesener M. S, Jurgensen J. S, Rosenberger C., Scholze CK., Horstrup J. H., Warnecke C., Mandriota S., Bechmann I., Frei U. A., Pugh C. W., Ratcliffe P. J., Bachmann S., Maxwell P. H., Eckardt K. U. (2003): *Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs*. *Faseb Journal* 17 (2) 271–273

Wykoff C. C, Beasley N. J., Watson P. H., Turner K. J., Pastorek J., Sibtain A., Wilson G. D., Turley H, Talks K. L., Maxwell P. H., Pugh C. W., Ratcliffe P. J., Harris A. L. (2000): *Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases*. *Cancer Research* 60 (24) 7075-7083

Wu D., Potluri N., Lu J., Kim Y., Rastinejad F. (2015): *Structural intergration in hypoxia-inducible factors*. *Nature* 524 (7565) 303-308

Zacharias D. A., Violin J. D., Newton A. C., Roger Y. Tsien R. Y. (2002): *Partitioning of Lipid-ModiPed Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells*. *Science* 296 (5569) 913-916

Zal T. und **Gascoigne** N. R. J. (2004): *Photobleaching-Corrected FRET Efficiency Imaging of Live Cells*. *Biophysical Journal* 86 (6) 3923–3939

Zheng L., Baumann U., Reymond J. (2004): *An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol*. *Nucleic Acids Research* 32 (14) 1-5

Zhong H., De Marzo A. M., Laughner E, Lim M., Hilton D. A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W. B., Semenza G. L., Simons J. W. (1999): *Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1a in Common Human Cancers and Their Metastases*. *Cancer Research* 59 (22) 5830–5835

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei den Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben und die mir sehr geholfen haben.

Ich danke:

Prof. Dr. Joachim Fandrey für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, nützliche Ratschläge bei den Ergebnis-Besprechungen und neue Ansätze für die weiteren Experimente.

Prof. Dr. Matthias Epple für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Eric Metzen für die Bereitstellung der Gal4- und HA-Fusionsplasmide für die Co-Immunpräzipitations-Versuche.

Dr. rer. medic. Andre Bernardini für seine Einweisung in die FRET-Apparatur und Hilfe bei der Auswertung der FRET-Ergebnisse.

Dr. rer. nat. Ulf Brockmeier für seine große Unterstützung bei meinen mikrobiologischen Experimenten, besonders bei der Korrektur von Mutationen in Plasmiden.

Dr. rer. medic. Teresa Otto für ihre Tipps für die Durchführung der Laborexperimente und ihre Bereitschaft, bei aufgetreten Schwierigkeiten zu helfen.

Dr. rer. nat. Katrin Prost-Fingerle für unsere Besprechung mancher Ergebnisse, ihre Tipps für die Durchführung der Co-Immunpräzipitations-Versuche sowie Tipps für das Schreiben der Dissertation.

Prof. David Hoogewijs und seine gesamte Arbeitsgruppe für Offenheit, Respekt, Toleranz und Kollegialität.

Besonders Maria Suarez Alonso für ihre sonnige Art, ihr Verständnis und ihre Flexibilität im täglichen Arbeitsablauf. Fehlen tun mir interessante und lustige Gespräche in der Kantine sowie zahlreiche Diskussionen über Wissenschaft.

Dr. rer. nat. Theresa Köhler für ihre freundliche und kollegiale Art. Mit dir, Theresa, würde ich jederzeit das Büro teilen!

Buena Delos Reyes für die Unterstützung bei der Durchführung mancher Laborexperimente.

Claudia Lodewick und Silke Lauterbach für ihre Hilfsbereitschaft bei logistischen Problemen.

Agnes Neugebauer und Melanie Baumann für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung mancher meiner Laborversuche.

Ute Häusler für ihre aufrichtig freundliche Art und Hilfe bei bürokratisch-administrativen Herausforderungen.

Meinen Kollegen Dr. rer. nat. Helmut Bühler und Dr. rer. nat. Günther Reznicek, die ich noch mehr während meiner Promotionszeit zu schätzen lernte, für ihre Ratschläge bezüglich mancher Laborexperimente. Danke auch für die coolen Grill- und Wein-Abende zusammen mit anderen Kollegen und Freunden.

Meiner Kollegin und Freundin Pascaline Nguemgo Kouam, die mich sehr gut in manchen schwierigen Situationen während meiner Promotion aufgemuntert und geduldig zugehört hat, wenn ich mich über so einiges bei ihr beschwert habe.

Allen meinen tollen Freunden, ohne die, manche harte Tage während meiner Promotionszeit schwer zu überstehen gewesen wären.

Meinen Eltern für ihre Großzügigkeit und Unterstützung in jeder Lebenssituation.

Lars Fischer für seinen Sinn für Humor, seine Geduld, ständige Bereitschaft, mir das Leben einfacher zu machen und dafür, dass er für mich da ist.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die dreijährige Finanzierung meiner Promotion.

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2 c) – 2 f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik der Universität Duisburg-Essen vom 04. Februar 2010 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig verfasst habe, bei mir keine vorausgegangenen Promotionsverfahren in dem betreffenden Fach oder in einem anderen Fach stattgefunden haben, dass ich bei der Abfassung der Dissertation keine anderen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe, sowie dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren eingereicht habe.

München, den

Pisarenko, Irina

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.